



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Noves funcions de PrP^c en neurotransmissió, neuroprotecció i neurodegeneració

Andreu Matamoros i Anglès



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

INSTITUT DE BIOINGINYERIA DE CATALUNYA (IBEC)
PARC CIENTÍFIC DE BARCELONA

Noves funcions de PrP^C en neurotransmissió, neuroprotecció i neurodegeneració

Memòria presentada pel graduat en Biologia

Andreu Matamoros i Anglès

per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Aquesta tesis s'ha emmarcat en el programa de Doctorat en Biomedicina de la Universitat de Barcelona. El treball experimental i la redacció de la present memòria han estat realitzats a l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya sota la direcció del Dr. José Antonio del Río Fernández, Catedràtic de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, 2019

Director i tutor de la Tesis

Dr. José Antonio del Río Fernández

El Candidat a Doctor

Andreu Matamoros i Anglès



A la portada observem un cultiu neuronal il·lustrat
amb la tècnica fotogràfica de la cianotípia

Realitzat per Vicent Matamoros i Anglès,
professor de la Facultat de Belles Arts (UB)

Pròleg

“This states that once ‘information’ has passed into protein it cannot get out again. In more detail, the transfer of information from nucleic acid to nucleic acid, or from nucleic acid to protein may be possible, but transfer from protein to protein, or from protein to nucleic acid is impossible.”

On Protein Synthesis, Symp Soc Exp Biol 12, pàg. 153. Francis Crick, 1958

El 1958, el Dr. Francis Crick, conegut per la seva participació en el descobriment de l'estructura de l'ADN (Watson and Crick, 1953), escrivia aquest paràgraf sobre el que va anomenar el Dogma Central de la Biologia (Crick, 1958). Concretament, explicava que la transmissió d'informació genètica només tenia un sentit i era irreversible: de l'ADN a l'ARN i de l'ARN a la proteïna. Concebia a més que una proteïna no podia transmetre “informació” cap a un àcid nucleic o una altra proteïna.

La investigació del darrer lustre ha ampliat i modificat aquest model plantejat per Crick. En aquesta tesi estudiem una de les primeres descobertes que van modificar aquest postulat: el prió, una proteïna capaç de replicar-se autònomament transmetent la seva informació estructural a una altra proteïna modificant-la sense necessitar cap àcid nucleic. Fou descobert pel Dr. Stanley Prusiner (Prusiner, 1982) guardonat amb el Premi Nobel el 1997.

El terme *prió* va ser descrit pel propi Prusiner i prové de l'anglès *protein only*. Va descobrir que l'agent causant de la degeneració *scrapie*, el que avui en dia coneixem com a Prionopaties, era només una proteïna ja que solament els tractaments que degradaven la fracció proteica eliminaven la seva capacitat infectiva. El descobriment dels prions va ser un gran avenç en la història de la biologia i la medicina. Va modificar el Dogma Central de la Biologia i va suposar un canvi de paradigma en els models d'infectivitat: demostrava que una proteïna *per se* podia ser un agent infecciós.

El present projecte, més de trenta anys després, se centra en l'estudi d'aquest agent infecciós que va revolucionar la biologia moderna: la proteïna priònica, precursora del prió. La meua vinculació amb aquesta projecte s'inicia al 2012 amb el treball de final de grau que encadenaria amb el Màster. I, gràcies a la *beca Predoctoral en Neurociencia* de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno, es continua amb la present tesi doctoral. Aquest treball segueix la línia d'investigació del grup sobre el paper de la proteïna priònica en funcions fisiològiques com la neurotransmissió, la diferenciació neuronal i en la malaltia d'Alzheimer. Es resumirà l'estat del coneixement i s'aportarà nova informació amb tres publicacions sobre el paper d'aquesta proteïna en neurotransmissió, neuroprotecció i neurodegeneració.

*“ I don’t believe there would be any
science at all without intuition”*

Rita Levi Montalcini

ÍNDEX

ÍNDEX.....	1
Abreviacions.....	7
Llista de figures i taules.....	13
INTRODUCCIÓ.....	17
1. La proteïna priònica cel·lular (PrP ^C).....	17
1.1. El gen <i>Prnp</i> i la seva expressió.....	17
1.2. Estructura de la proteïna PrP ^C	18
1.2.1. El domini N-terminal.....	19
1.2.2. El domini globular.....	19
1.3. La conformació <i>scrapie</i> (PrP ^{Sc}) i la seva agregació.....	20
1.4. Les Prionopaties.....	22
1.4.1. Incidència de les Prionopaties.....	22
1.4.2. Prionopaties familiars.....	23
1.4.3. Prionopaties d'origen esporàdic.....	26
1.4.4. Prionopaties adquirides.....	27
1.4.5. Diagnosi i teràpia de les Prionopaties.....	29
2. Funcions fisiològiques de PrP ^C	31
2.1. Models d'estudi de PrP ^C	31
2.1.1. Models animals no murins.....	32
2.1.2. Model de ratolí.....	32
2.2. PrP ^C : Regulació de la fisiologia sinàptica.....	37
2.2.1. La sinapsi.....	37
2.2.2. El glutamat i els receptors glutamatèrgics.....	38
2.2.3. Excitabilitat, excitotoxicitat i epilèpsia.....	43
2.2.4. Funcions de PrP ^C a la sinapsi glutamatèrgica i els seus receptors.....	45
2.3. PrP ^C : Paper en l'epilèpsia i l'hipocamp.....	47
2.3.1. Epilèpsia: el glutamat i el GABA.....	48

2.3.2. Models animals d'estudi de l'epilèpsia	48
2.3.3. L'hipocamp com a model d'estudi	49
2.3.4. Funció neuroprotectora de PrP ^C a l'epilèpsia	53
2.3.5. La potenciació a llarg termini	54
2.3.6. Participació de la PrP ^C en l'LTP: Antecedents	56
2.3.7. Efecte de l'absència de PrP ^C en aprenentatge i conducta	57
2.4. PrP^C: Altres funcions fisiològiques.....	58
2.4.1. Rol de PrP ^C en el manteniment de la mielinització del SNP	58
2.4.2. PrP ^C en el desenvolupament, la proliferació i la diferenciació del SNC	58
3. Paper de PrP^C en altres malalties neurodegeneratives.....	60
3.1. PrP^C i la malaltia d'Alzheimer.....	60
3.1.1. La malaltia d'Alzheimer	61
3.1.2. La proteïna Tau	62
3.1.3. Les Taupaties	65
3.1.4. Implicació de PrP ^C en la malaltia d'Alzheimer	66
3.2. PrP^C: receptor amiloide.....	68
3.2.1. Funció de la PrP ^C com a receptor de l' α -sinucleïna i la seva propagació	68
3.2.2. Rol de la PrP ^C en l'agregació amiloide	69
3.3. Comorbiditat entre Prionopaties i Taupaties.....	70
3.3.1. Relació entre Prionopaties i Taupaties	70
3.4. Eines d'estudi de les malalties neurodegeneratives.....	72
3.4.1. De les mostres <i>post mortem</i> a les cèl·lules mare pluripotents induïdes	73
OBJECTIUS.....	79
RESULTATS.....	87
1. Capítol I.....	89
Cultius derivats d' <i>iPSC</i> provinents d'un pacient de GSS amb la mutació Y218N- <i>Prnp</i> recapitulen la Taupatia	

2. Capítol II.....	115
Paper de PrP ^C en l'excitotoxicitat induïda per àcid kaínic en diferents soques de ratolins	
3. Capítol III.....	145
Alteracions en el comportament, dèficits d'aprenentatge i una elevada excitabilitat hipocàmpica en el ratolí genoanul·lat per la PrP ^C	
RESUM DE RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	185
1. Les iPSC derivades d'una pacient de GSS amb la mutació Y218N reproduïxen el fenotip neurodegeneratiu de la Taupatia	188
2. La PrP ^C exerceix un paper neuroprotector a l'epilèpsia induïda per l'àcid kaínic.....	195
3. L'absència de la PrP ^C incrementa l'excitabilitat sinàptica i provoca deficiències en el comportament del nou model ZH3-Prnp ^{0/0}	201
4. La PrP ^C , bastida sinàptica amb múltiples acompanyants.....	209
5. Perspectives de futur en l'estudi de la PrP ^C	214
CONCLUSIONS.....	221
BIBLIOGRAFIA.....	225
ANNEX	253
Informe del actor d'impacte	253
Informe de participació	255

ABREVIACIONES

AA	aminoàcid
AD	de l'anglès, Alzheimer disease
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionat
ApoE	apolipoproteïna E
APP	de l'anglès, amyloid precursor protein
Argo	argonauta
Aβ	de l'anglès, amyloid beta
BACE1	de l'anglès, beta-secretase 1
BSE	de l'anglès, Bovine Spongiform Encephalopathy
CA1/CA2/CA3	regió <i>Cornu Ammonis</i> 1 / 2 / 3
CAMKII	de l'anglès, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CBD	de l'anglès, corticobasal degeneration
CC₁/CC₂	de l'anglès, charge cluster 1 / 2
Cdk5	de l'anglès, cyclin-dependent kinase 5
DG	de l'anglès, dentate gyrus
DPP6	de l'anglès, dipeptidyl peptidase like 6
EEAT	de l'anglès, excitatory amino acid transporter
EPSP	de l'anglès, excitatory postsynaptic potential
ERK	de l'anglès, extracellular signal-regulated kinases
ESC	de l'anglès, embrionic stem cell
fAD	de l'anglès, familial Alzheimer disease
fCJD	de l'anglès, familial Creutzfeldt-Jakob disease
fEPSP	de l'anglès, field EPSP
FFI	de l'anglès, Fatal Familial Insomnia
FTD	de l'anglès, Frontotemporal Dementia
FTDP-47	de l'anglès, FTD with parkinsonism linked to chromosome 17
GABA	de l'anglès, γ -aminobutyric acid
GFAP	de l'anglès, glial fibrillary acidic protein
GGT	de l'anglès, Globular glial Tauopathy
gl	de l'anglès, granular layer
Gli	de l'anglès, glimepiride
GPCR	de l'anglès, G protein-coupled receptor
GPI	de l'anglès, glycosylphosphatidylinositol domain
GPIp	de l'anglès, GPI precursor
GSK3	de l'anglès, glycogen synthase kinase 3

GSS	de l'anglès, Gerstmann–Sträussler–Scheinker Syndrome
h	de l'anglès, hilus
HFS	de l'anglès, high frequency stimulation
HR	de l'anglès, Hydrophobic region
iCJD	de l'anglès, iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease
iGluRs	de l'anglès, ionotropic glutamate receptors
iPSC	de l'anglès, induced pluripotent stem cell
IPSP	de l'anglès, inhibitory postsynaptic potential
KA	de l'anglès, kainic acid
KLF4	de l'anglès, Kruppel-like factor 4
Kv 4.2	de l'anglès, voltage-gated K(+) channel 4.2
LTD	de l'anglès, long term depression
LTP	de l'anglès, long term potentiation
MAP-2	de l'anglès, microtubule-associated protein 2
Mapt	de l'anglès, microtubule-associated protein tau (gen)
mGluRs	de l'anglès, metabotropic glutamate receptors
ml	de l'anglès, molecular layer
MMSE	de l'anglès, Mini Mental State Examination
MTs	microtúbuls
NCAM	de l'anglès, neural cell adhesion molecule
NFL	de l'anglès, neurofilament light chain
NFT	de l'anglès, neurofibrillary tangle
NMDA	N-metil-d-aspartat
NP	de l'anglès, neural precursors
OCT4	de l'anglès, octamer-binding transcription factor 4
OPRD	de l'anglès, octa-peptide repeat deletion
OPRI	de l'anglès, octa-peptide repeat insertion
OR	de l'anglès, octarepeats domain
PCMA	de l'anglès, protein misfolding cyclic amplification
PD	de l'anglès, Parkinson disease
PK	de l'anglès, proteinase K
PKA	de l'anglès, protein kinase A
PKC	de l'anglès, protein kinase C
PLC	de l'anglès, phospholipase C
PP	de l'anglès, paired-pulse
PPD	de l'anglès, paired-pulse depression

PPF	de l'anglès, paired-pulse facilitation
Prnp	proteïna priònica cel·lular (gen)
PrP^C	proteïna priònica cel·lular
PrP^{res}	proteïna priònica resistent
PrP^{Sc}	proteïna priònica <i>scrapie</i>
PS1	presenilina 1
PSD	de l'anglès, postsynaptic density
PSP	de l'anglès, progressive supranuclear palsy
PTZ	pentilenetetrazol
Rho	de l'anglès, Ras homologous
Rt-QuIC	de l'anglès, real-time quacking-induced conversion
sAHP	de l'anglès, slow afterhyperpolarization
sCJD	de l'anglès, sporadic Creutzfeldt-Jakob disease
SE	<i>status epilepticus</i>
sFFI	de l'anglès, sporadic Fatal Familial Insomnia
SGZ	de l'anglès, subgranular zone
sl	<i>stratum lucidum</i>
slm	<i>stratum lacunosum moleculare</i>
SNC	Sistema nerviós central
SNP	Sistema nerviós perifèric
so	<i>stratum oriens</i>
SOX2	de l'anglès, sex determining region Y-box 2
SP	de l'anglès, Signal peptide
sp	<i>stratum pyramidale</i>
SSEA-3 / SSEA-4	de l'anglès, stage specific embryonic antigen 3 / 4
SVZ	de l'anglès, subventricular zone
TARP	de l'anglès, transmembrane AMPA receptor regulatory protein
TDP-43	de l'anglès, TAR DNA-binding protein 43
TLE	de l'anglès, temporal lobe epilepsy
vCJD	de l'anglès, variant Creutzfeldt-Jakob disease
VGCC	de l'anglès, voltage-gated calcium channel
Vglut	de l'anglès, vesicular glutamate transporter
VPSPr	de l'anglès, Variably protease-sensitive Prionopathy
WB	de l'anglès, tècnica del western blot

LLISTA DE FIGURES I TAULES

FIGURES

Figura 1: Estructura de la PrP ^C	20
Figura 2: Representació del cicle de nucleació de la PrP ^{Sc}	21
Figura 3: Casos de Prionopaties confirmats i possibles notificats a l'Estat espanyol en el període 1998-2017.....	23
Figura 4: Mutacions que cursen amb Prionopaties familiars.....	24
Figura 5: Anàlisi immunohistoquímica dels d'agregats de PrP ^{Sc} en diferents subtipus de Prionopatia.....	28
Figura 6: Efectes de l'entrada massiva de Ca ²⁺ que condueixen a la mort neuronal per excitotoxicitat.....	45
Figura 7: Complexos proteics amb els que la PrP ^C interacciona a la sinapsis.....	47
Figura 8: Esquema de l'hipocamp dorsal de ratolí.....	50
Figura 9: Circuit trisinàptic de l'hipocamp.....	52
Figura 10: Activació de la via CaMKII per la inducció de la potenciació a llarg termini....	56
Figura 11: Esquema del gen Mapt i les isoformes que es generen per <i>splicing</i> al SNC..	64
Figura 12: La importància de l'equilibri dinàmic de la unió de Tau als microtúbuls.....	65
Figura 13: La PrP ^C com a receptor d'agregats en diferents neurodegeneratives.....	70
Figura 14: Anàlisi immunohistoquímica del pacient de GSS-Y218N.....	72
Figura 15: Esquema conceptual resumint els resultats obtinguts en aquesta tesi.....	213

TAULES

Taula 1: Subtipus de Prionopaties organitzades segons la seva etiologia.....	22
Taula 2 : Models de ratolí amb deleció constitutiva de <i>Prnp</i>	35
Taula 3: Resum dels receptors ionotròpics i metabotròpics de glutamat.....	43

INTRODUCCIÓ

1. La proteïna priònica cel·lular (PrP^C)

En aquest primer apartat s'introduirà la proteïna priònica i les Prionopaties, concretament s'explicarà: 1) l'estructura i l'expressió del gen que la codifica; 2) els dominis que formen la proteïna; 3) la conformació patogènica i la seva agregació; i 4) la família de malalties que ocasionen la seva acumulació i mal plegament, les Prionopaties.

1.1 El gen *Prnp* i la seva expressió

La proteïna priònica cel·lular (PrP^C) està codificada pel gen *Prnp* (Chesebro *et al.*, 1985; Basler *et al.*, 1986). Es va anomenar “cel·lular” per diferenciar-la de la conformació patogènica *scrapie*, (PrP^{Sc}) de la qual es parlarà més endavant (Apartat 1.1). És un gen de 16Kb situat al cromosoma 20 humà, concretament a la regió 20p13. Està conformat per dos exons. L'exó 2 és el que conté la informació codificant i l'exó 1 s'elimina per *splicing*. Es creu que el primer exó funciona com a regió d'iniciació transcripcional (Puckett *et al.*, 1991). En rates i ratolins el gen té 3 exons i la tota la regió codificant es concentra al tercer exó (Westaway *et al.*, 1994a).

Durant el desenvolupament embrionari murí, l'expressió de l'ARN missatger (ARNm) es detecta a partir de l'estadi embrionari E7,5 a les membranes extraembrionals i a l'al·lantoide. A E8,5 es comença a observar al mesencèfal i romboencèfal. A partir de l'estadi E13,5 apareix la proteïna al prosencèfal, al telencèfal, al plexe coroides del quart ventricle, la medul·la espinal i els ulls (Manson *et al.*, 1992; Asante *et al.*, 2002). Pel que fa a l'adult, la PrP^C s'expressa de forma generalitzada a tot el sistema nerviós central (SNC), tot i que notòriament s'expressa al cerebel, a l'hipocamp, al bulb olfactori i al nucli estriat (Sales *et al.*, 1998). A nivell cel·lular, presenta nivells d'expressió elevats a les neurones i astròcits, en canvi, als oligodendròcits i la micròglia aquesta és reduïda. Es troba també expressada al sistema nerviós perifèric (SNP), al múscul, als testicles i als teixits limfoides (Kretzschmar *et al.*, 1986; Moser *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1998).

L'expressió de PrP^C està conservada evolutivament, es troba a la majoria de les classes de vertebrats: mamífers, aus, rèptils, amfibis i peixos. Gran part de la seva estructura està conservada i el gen no és especialment polimòrfic, denotant la importància de la seva funció (Harrison *et al.*, 2010). En humans s'han descrit només dos polimorfismes no sinònims amb una freqüència al·lèlica superior a l'1%, el M129V i el E219K (Watts *et al.*, 2018).

Actualment s'accepta que la família de gens de prions tindria tres membres: *Prnp* i els seus dos gens paràlegs, *Prnd* i *Sprn*. Aquest codifiquen per les proteïnes Doppel i Shadoo respectivament (Watts and Westaway, 2007; Westaway *et al.*, 2011), que igual que la PrP^C, es troben ancorades a la membrana. Des del seu descobriment, s'han estudiat per intentar entendre la seva possible participació en les Prionopaties degut a la seva estructura semblant a la PrP^C. Doppel s'expressa sobretot als testicles on regula la gametogènesi. El gen *Prnd* està molt proper a *Prnp*, al mateix cromosoma. La seva funció en el SNC no està descrita, només es coneix que la seva sobreexpressió provoca degeneració cerebelar (Moore *et al.*, 1999). Shadoo regula l'embriogènesi i s'expressa sobretot al SNC. L'*Sprn* es troba al cromosoma 7 en ratolins i al 10 en humans i la seva expressió coincideix amb la de la PrP^C. La deleció doble de *Prnp* i *Sprn* genera letalitat embrionària. Això suggereix que participa en mecanismes compensatoris en l'estadi embrionari davant l'absència de PrP^C (Young *et al.*, 2009; Passet *et al.*, 2013; Makzhami *et al.*, 2014).

1.2 Estructura de la proteïna PrP^C

El gen *Prnp* codifica per una proteïna de 253 aminoàcids (AA) subjecta a varies modificacions postraduccionals generant una proteïna madura de 209 AA (Figura 1). A la regió N-terminal es troba un pèptid senyal (SP) que condueix la proteïna al reticle endoplasmàtic on serà modificada postraduccionalment. Des d'allà, iniciarà el seu trànsit fins a la membrana plasmàtica per la via de secreció vesicular passant per l'aparell de Golgi. Durant aquest recorregut, s'eliminaran els primers 23 AA del pèptid senyal N-terminal, se li afegiran fins a dos glicosilacions, un pont disulfur i un grup glicosilfosfatidilinositol (GPI) a l'extrem C-terminal. Aquest permet l'ancoratge a la part exterior de la membrana plasmàtica i dirigeix la proteïna als raïls lipídics de la membrana cel·lular. Durant aquest procés, s'eliminen 22 AA del pèptid senyal C-terminal precursor del GPI (GPIp) (Stahl *et al.*, 1987; Naslavsky *et al.*, 1997; Bagyinszky *et al.*, 2018). Recentment, s'ha publicat que la PrP^C es trobaria també al mitocondri amb el C-terminal ancorat a la membrana externa i la part N-terminal a l'espai intermembrana (Faris *et al.*, 2017a).

La PrP^C sofreix un cicle constitutiu de reciclatge i degradació vesicular mitjançant endocitosis regulada per Caveolina o depenent de Clatrina (Morris *et al.*, 2006; Taylor and Hooper, 2006). Presenta dues regions pel que fa a la seva estructura terciària: una regió N-terminal flexible sense conformació definida i una regió C-terminal globular i estructurada (Linden *et al.*, 2008; Watts *et al.*, 2018). La informació concreta de la posició de les regions que emprarem en aquesta tesi està referida a la PrP^C del ratolí (Figura 1).

1.2.1 El domini N-terminal

Després d'eliminar-se el pèptid senyal cap al reticle, el primer domini que presenta l'extrem N-terminal és una regió carregada positivament, el domini carregat positivament 1 (CC₁) que s'ha relacionat amb l'endocitosis de la proteïna (Shyng *et al.*, 1995). Després es troba un domini amb quatre repeticions (R1-R2-R3-R4) de vuit aminoàcids (PHGGGWGQ), la regió dels *octarepeats* (OR). Els OR s'uneixen a cations divalents com el Cu²⁺ i el Zn²⁺. Aquesta unió regula l'endocitosis de la PrP^C i la pròpia homeòstasi dels cations afectant a la dinàmica sinàptica (Brown *et al.*, 1997; Walter *et al.*, 2007). A continuació, presenta un domini central carregat positivament (CC₂) i un domini hidrofòbic (HD) (Figura 1). Aquest darrer està molt conservat evolutivament i es postula que podria tenir un paper important en la resposta de PrP^C a l'estrès (Rambold *et al.*, 2008; Watts *et al.*, 2018).

1.2.2 El domini globular

La regió C-terminal té una estructura definida formada per dos petites regions en forma de làmina beta (128-131 i 161-164) i tres hèlixs alfa (144-154, 173-194 i 200-228). Aquesta regió sofreix modificacions postraduccionals, un pont disulfur entre dues hèlix alfa (Cys179-Cys214) i fins a dues N-glicosilacions (Asn180 i Asn196). S'han descrit diferents N-glicans que s'hi uneixen amb una distribució diferent al llarg del SNC. Es postula que podria ser la causa de la diferència d'infectivitat que hi ha entre diferents regions del cervell a les Prionopaties (Beringue *et al.*, 2003; Linden *et al.*, 2008). Finalment, s'elimina el pèptid senyal a membrana que és el precursor del GPI que s'insereix encara la proteïna a la membrana (Stahl *et al.*, 1987) (Figura 1).

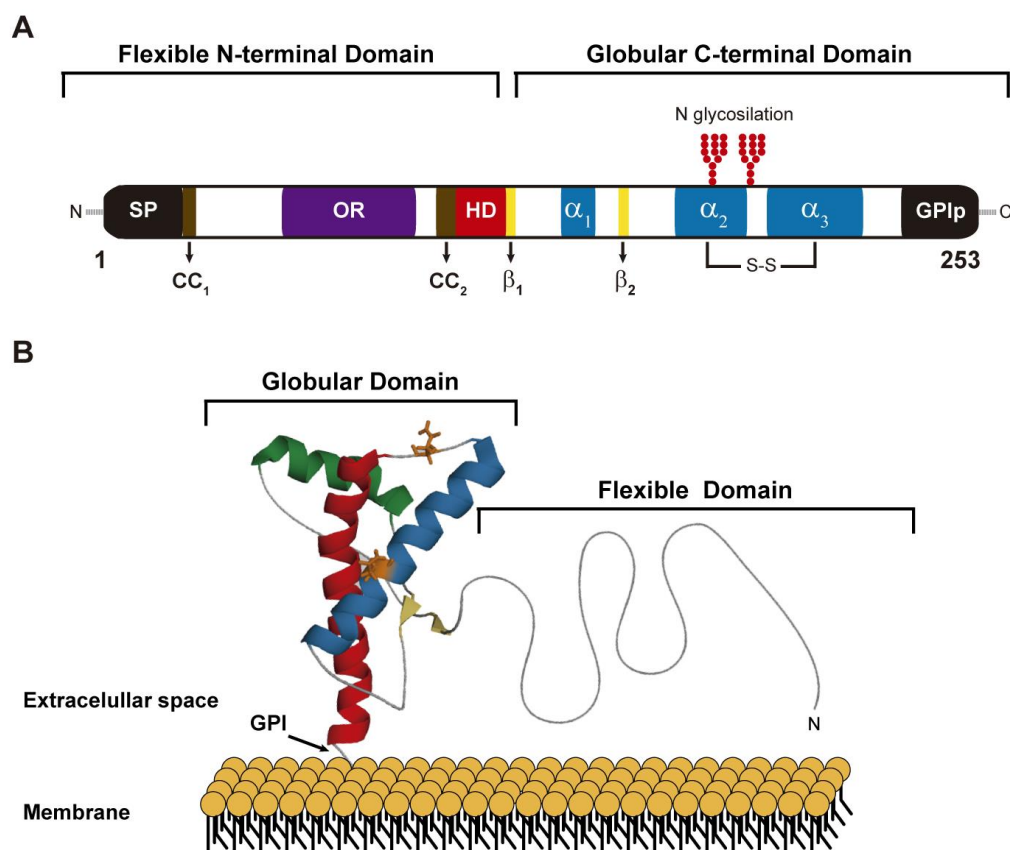


Figura 1: Estructura de la PrP^C. A) Esquema dels dominis de la PrP^C immadura. En negre trobem els dos pèptids senyals que s'eliminaran durant la maduració de la proteïna, l'N-terminal (SP) i el C-terminal, precursor del GPI (GPIp). En blau i groc, trobem les hèlix alfa (α1-3) i les làmines beta (β1-2), respectivament. El domini dels octarepeats (OR) està representat en lila, els dominis carregats positivament en marró (CC1-2) i en roig el domini hidrofòbic (HR). També estan representades les dues glicosilacions i el pont disulfur (S-S). B) Representació tridimensional de la PrP^C madura ancorada a la membrana. S'observa el domini globular estable i el domini flexible N-terminal. L'esquema de la conformació s'ha adaptat de Watts, et al. 2018.

1.3. La conformació *scrapie* (PrP^{Sc}) i la seva agregació

Es va definir el *prió* com l'agent proteic causant de les Prionopaties (Prusiner, 1982). Consisteix en la PrP^C amb una conformació patològica, anomenada *scrapie*. Se li va posar aquest nom referint-se a la patologia priònica que sofreixen ovins i caprins. També s'ha anomenat resistent (PrP^{Res}) per la seva capacitat de no ser degradada totalment per proteases (Linden *et al.*, 2008; Scheckel and Aguzzi, 2018). Més que la seva estructura específica, el que confereix la infectivitat priònica a la PrP^{Sc} són els propagons que genera. Es considera un propagó la unitat mínima de proteïnes mal plegades que són capaces d'autoreplicar-se i agregar-se (Cox *et al.*, 2003).

S'han plantejat diverses teories de com s'agrega la PrP^{Sc}, actualment la més acceptada és la nucleació, on algun agent extern desencadenaria el plegament anòmal de la PrP^C. Podria ser degut a una mutació a *Prnp*, la sobreexpressió de la PrP^C, l'envelliment dels sistemes de control o algun estrès cel·lular. La proteïna mal plegada pot ser replegada per les *Heat shock proteins*, degradada pel proteosoma o agregar-se formant els β -oligòmers patogènics. Aquests β -oligòmers poden generar estructures més grans incorporant altres PrP^{Sc} o PrP^C. Així es formen les protofibril·les i després les fibril·les (Figura 2). La fragmentació d'aquestes estructures més grans genera nous propagons que poden reiniciar el cicle de nucleació, incrementar l'agregació i "infectar" altres estructures (Sweeney *et al.*, 2017; Scheckel and Aguzzi, 2018).

La PrP^C i la PrP^{Sc} comparteixen la mateixa seqüència d'aminoàcids, però la seva estructura terciària difereix notablement. La PrP^C està enriquida amb estructures hèlix alfa i en canvi la PrP^{Sc} presenta majoritàriament estructures en forma de làmina beta. Aquests canvis conformationals modifiquen les propietats de PrP^{Sc} que esdevé insoluble a detergents i parcialment resistent a les proteases (Colby and Prusiner, 2011; Takada *et al.*, 2018).

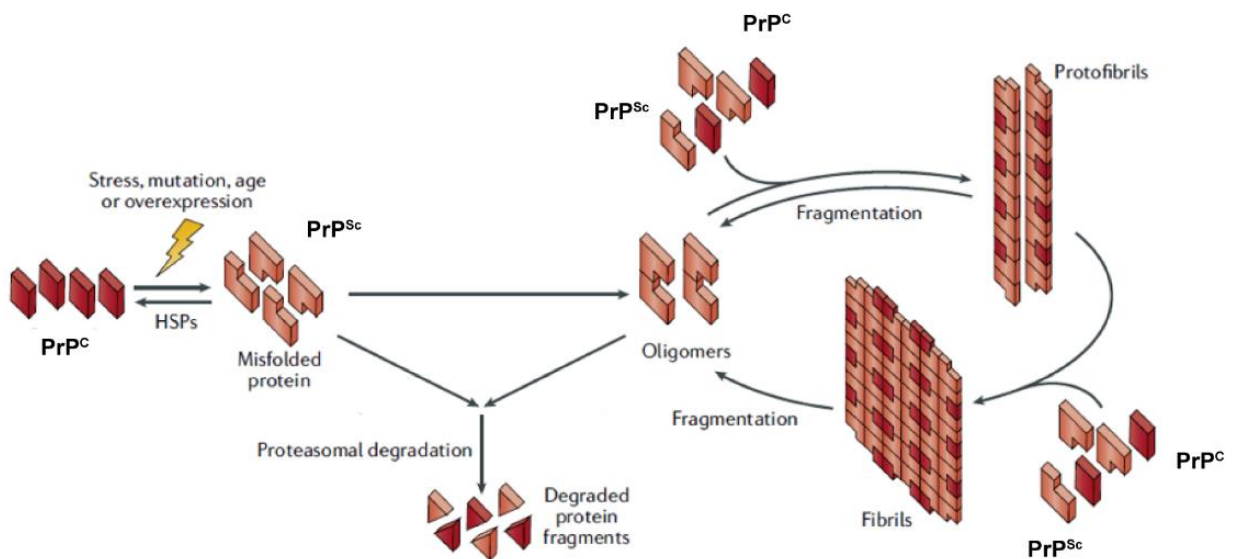


Figura 2: Representació del cicle de nucleació de la PrP^{Sc}. La sobreexpressió, l'envelliment, alguna mutació o un estrès cel·lular indueixen el mal plegament de PrP^C. La PrP^{Sc} pot ser degradada via proteosoma o formar oligòmers. Aquests poden incorporar més PrP^{Sc} i PrP^C generant protofibril·les i fibril·les, les quals es poden fragmentar i generar nous propagons per iniciar de nou el cicle. Adaptat de Scheckel and Aguzzi, 2018.

1.4. Les Prionopaties

Les Encefalopaties Espongiformes Transmissibles, també anomenades Prionopaties, van començar a ser estudiades sobretot a conseqüència de la descripció del Kuru als anys 50. Des de llavors s'han descrit nou variants amb diferents etiologies i simptomatologia, però totes amb una causa comuna: el cúmul patogènic de PrP^{Sc} en el parènquima cerebral (Taula 1). S'agrupen en tres tipus segons el seu origen: esporàdic, genètic o adquirit. Independentment del seu origen, totes les Prionopaties són fatals, el pacient sobreviu de mitjana 1-2 anys després dels primers símptomes (Asher and Gregori, 2018).

Malaltia	Sigles	Etiologia	Descripció
Creutzfeldt-Jakob Esporàdic	sCJD	Esporàdica / Mutació somàtica	(Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921)
Insomni Familiar Fatal Esporàdic	sIFF		(Parchi <i>et al.</i> , 1999)
Prionopatia Variablement Resistent a Proteases	VPSP ^r		(Gambetti <i>et al.</i> , 2008)
Gerstmann-Straeussler-Scheinker	GSS	Mutacions a Prnp	(Gerstmann, 1928)
Insomni Familiar Fatal	IFF	Mutació D178N + 129MM/129MV	(Lugaresi <i>et al.</i> , 1986)
Creutzfeldt-Jakob Familiar	fCJD	Mutacions a Prnp	*(Goldgaber <i>et al.</i> , 1989)
Kuru	Kuru	Endocanibalisme	(Gajdusek and Zigas, 1957)
Creutzfeldt-Jakob iatrogènic	iCJD	Infecció iatrogènica	(Duffy <i>et al.</i> , 1974)
Variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob	vCJD	Infecció prions BSE	(Will <i>et al.</i> , 1996)

Taula 1: Subtipus de Prionopaties organitzades segons la seva etiologia. S'agrupen en esporàdiques, genètiques i adquirides. Es mostren també les sigles en anglès i la publicació on es descrigueren per primer cop. *Referència de la descripció de la mutació més comuna que causa fCJD, la E200K.

1.4.1 Incidència de les Prionopaties

La incidència de les Prionopaties és d'un o dos casos per milió de persones i any. No es disposa de dades concretes de la seva prevalença degut a la curta supervivència dels pacients. Entre el 85-90% són d'origen esporàdic, un 10 % genètic i menys de l'1% d'origen adquirit (Scheckel and Aguzzi, 2018; Takada *et al.*, 2018; Zerr and Parchi, 2018). A l'Estat espanyol s'han diagnosticat 1724 casos des de que es va començar a registrar detalladament el 1998, una vuitantena per any (Registro Nacional de Enfermedades Espongiformes Transmisibles Humanas. Centro Nacional de Epidemiología) (Figura 3).

S'ha observat que, independentment del seu origen, el polimorfisme de l'AA 129 de la PrP^C condiciona la clínica de la malaltia. L'heterozigosi metionina/valina (129MV) i l'homozigosi valina/valina (129VV) en redueix la susceptibilitat, tot i que no fa impossible cursar-la. Sembla que els pacients 129MV i 129VV presenten períodes d'incubació més llargs i se'ls endarrereixen l'aparició dels símptomes (Scheckel and Aguzzi, 2018).

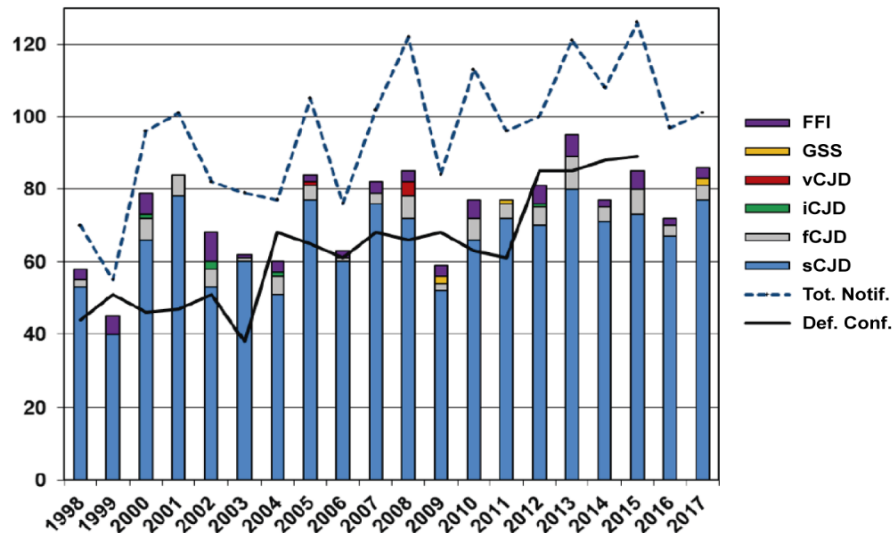


Figura 3: Casos de Prionopaties confirmats i possibles notificats a l'Estat espanyol en el període 1998-2017. Amb un codi de colors es presenten el nombre d'afectats de cada subtipus. La línia discontinua mostra el total de casos notificats (confirmats o no) i la contínua el nombre de defuncions per Prionopatia. Gràfica adaptada de l'informe del 18 d'Abril de Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III.

1.4.2 Prionopaties familiars

Les Prionopaties d'origen familiar o genètic remeten a mutacions al gen *Prnp* (Figura 4). Es postula que les mutacions a la PrP^C li confereixen més susceptibilitat al plegament patogènic. La majoria dels casos es deuen a mutacions de sentit erroni on es substitueix un aminoàcid. Fins al moment, se n'han descrit 35, majoritàriament al domini globular (Takada *et al.*, 2017). S'han observat també insercions i delecions de seqüències curtes d'aminoàcids, sobretot de la regió dels OR (OPRI i OPRD). Alguns treballs han mostrat que l'increment de regions repetides al domini OR augmenta l'afinitat entre la PrP^C i la PrP^{Sc} accelerant la nucleació (Moore *et al.*, 2006). Finalment, s'han descrit també mutacions de sentit erroni on s'introdueix un codó de terminació al domini globular eliminant així el domini GPI, com la Q160X (Fong *et al.*, 2017).

Introducció: La proteïna priònica cel·lular (PrP^C)

Abans que es descobrís el gen *Prnp* i les seves mutacions, es van categoritzar les Prionopaties familiars basant-se en la clínica. Trobem l'Insomni Familiar Fatal (FFI), la Síndrome de Gerstmann-Straeussler-Scheinker (GSS) i la malaltia de Creutzfeldt-Jakob familiar (fCJD). Tot i que es classifiquen en aquests grups, les manifestacions clíniques i patològiques són heterogènies i alguns casos no encaixen perfectament amb aquesta terminologia (Takada *et al.*, 2018).

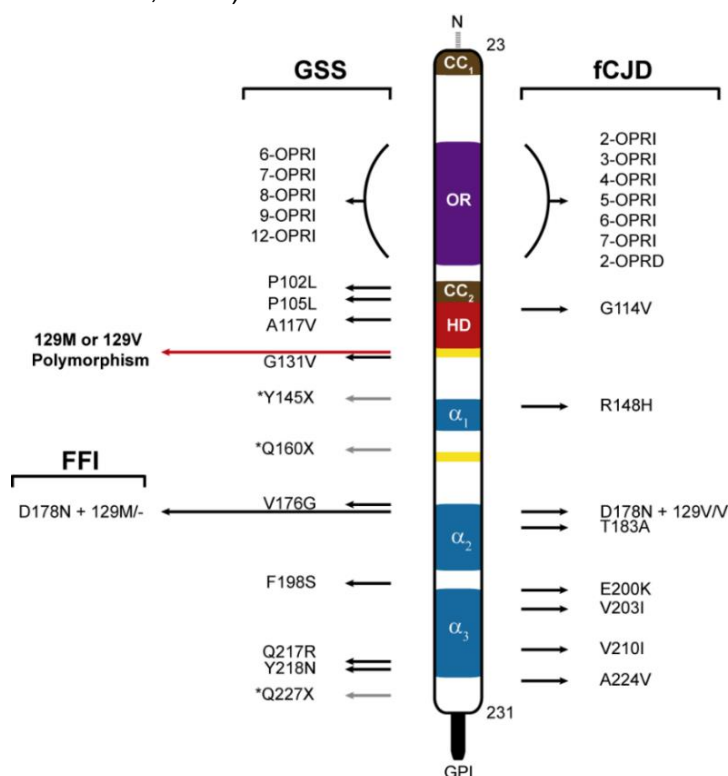


Figura 4: Mutacions que cursen amb Prionopaties familiars. Es presenten agrupades per les que causen FFI, GSS o fCJD. També es mostra amb una fletxa roja el polimorfisme 129 que modula la susceptibilitat a la malaltia. Com a exemple de la terminologia utilitzada, explicarem que la mutació A117V implica la substitució d'una alanina (A) per una Valina (V) a l'aminoàcid 117. Si la segona lletra és una X implica que apareix un codó de terminació i es genera una proteïna truncada. Les OPRI i OPRD son insercions i delecions dels *octarepeats*, respectivament. Les marcades amb un asterisc cursen una clínica i patologia atípiques que no s'agrupen en cap dels altres subtipus. Informació obtinguda de Takada *et al.*, 2017 i Scheckel and Aguzzi, 2018.

Insomni Familiar Fatal

El causa la mutació de sentit erroni D178N acompanyada de la presència d'almenys d'una metionina al codó 129 (Lugaresi *et al.*, 1986). De mitjana apareix entre els 55 i els 60 anys amb un espectre des dels 20 fins als 70. La supervivència mitjana és d'uns 15 mesos (Krasnianski *et al.*, 2014). Els cúmuls de PrP^{Sc} es troben principalment al tàlem. Cursa amb una disrupció del cicle de son-vigília, alteració dels ritmes circadianis, sobre-activació simpàtica i dèficits d'atenció (Takada *et al.*, 2018).

Síndrome de Gerstmann-Straeussler-Scheinker

La GSS porta el nom dels tres metges que la van descriure (Gerstmann, 1928; Gerstmann J *et al.*, 1936). Cursa amb una clínica molt heterogènia, però generalment cursa amb demència i dèficits motors com atàxia, paraparèsia espàstica i símptomes extrapiramidals. La histopatologia mostra agregats multicèntrics de PrP^{Sc} sobretot al cerebel i a la substància gris cortical (Figura 5A). La malaltia apareix de mitjana al voltant dels 50 anys amb un rang d'edat des dels 27 als 66. Presenten la supervivència des de l'aparició dels primers símptomes més llarga del conjunt de les Prionopaties, al voltant dels 4 anys, variant des de 7 mesos fins a 11 anys (Liberski and Ironside, 2004; Takada *et al.*, 2018).

Fins al moment, s'han descrit més de 20 insercions al domini OR (OPRI) i una quinzena de mutacions de canvi de sentit que cursen amb la GSS. La mutació P102L és la mutació més comuna (Hsiao *et al.*, 1989). També són remarcables les mutació amb 8 i 12 insercions, la 8-OPRI (Laplanche *et al.*, 1999) i la 12-OPRI (Kumar *et al.*, 2011); i les mutacions no sinònimes P105L (Yamazaki *et al.*, 1999), A117V (Tranchant *et al.*, 1997) i la Y218N (Alzualde *et al.*, 2010) (Figura 4). Molts pacients presenten comorbiditat clínica i histopatològica amb altres malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer (AD) i les Taupaties, fet que en dificulta el diagnòstic (Ishizawa *et al.*, 2002; Bagyinszky *et al.*, 2018; Takada *et al.*, 2018).

Malaltia de Creutzfeldt-Jakob familiar

S'han descrit una vintena de mutacions de sentit erroni i algunes OPRI relacionades amb el fCJD (Figura 4). La més comuna és la E200K (Goldgaber *et al.*, 1989). La D178N causa fCJD acompanyada del polimorfisme 129VV, sinó cursa amb FFI (Kretzschmar *et al.*, 1995). Apareix sobre els 60 anys amb un rang dels 20 als 90. La supervivència mitjana és de 5 mesos després de l'aparició dels símptomes, tot i que s'han descrit casos de 8 anys (Ladogana and Kovacs, 2018). Cursa amb una clínica heterogènia, però a grans trets els pacients presenten demència, símptomes cerebelars i extrapiramidals, mioclònia i desordres psiquiàtrics (Takada *et al.*, 2018).

1.4.3 Prionopaties d'origen esporàdic

Es defineixen com a esporàdics perquè no se'n coneix la causa. El plegament anòmal de PrP^C es produeix esporàdicament o per l'adquisició d'una mutació somàtica desconeguda. Entre aquestes, es troben la malaltia de Creutzfeldt-Jakob esporàdica (sCJD), l'Insomni Familiar Fatal esporàdic (sIFF) i la Prionopatia Variablement Resistent a Proteases (VPSPr).

Malaltia de Creutzfeldt-Jakob esporàdica

L'aparició del sCJD és, de mitjana, entre els 60 i 70 anys. És la Prionopatia més freqüent, representant el 85-90% dels casos. No obstant, trobem casos entre els 20 i els 90 anys. La supervivència mitjana després de l'aparició dels primers símptomes és de 6 mesos, tot i que hi ha casos més dramàtics on els pacients traspassen a les poques setmanes i d'altres que sobreviuen alguns anys. La major supervivència correlaciona amb el sexe, l'aparició prematura de la malaltia i l'heterogeneïtat 129MV (Pocchiari *et al.*, 2004). La clínica del sCJD és molt variada, però la majoria dels casos cursen amb mioclònia, demència, atàxia, anormalitat en el to muscular i trastorns psiquiàtrics (Zerr and Parchi, 2018). S'han descrit dos tipus de PrP^{Sc} segons el patró de bandes que formen en un gel de poliacrilamida després de digerir-la amb proteïnasa K (PK). S'han descrit 6 subtipus de sCJD segons el polimorfisme al codó 129 (MM, MV o VV) i el tipus de PrP^{Sc} que presenten (1 o 2): MM1, MV1, VV1, MM2, MV2 i VV2. Entre els subtipus s'observen diferències clíniques i histopatològiques (Figura 5B-D), la majoria dels casos són MM1, MV2 i VV2 (Palmer *et al.*, 1991; Zerr and Parchi, 2018).

Prionopatia Variablement Resistent a Proteases

Va ser descrita el 2008 i se n'han diagnosticat una quarantena de casos (Gambetti *et al.*, 2008). A diferència de les altres Prionopaties, la PrP^{Sc} de la VPSPr no és pràcticament resistent a les proteases. Va ser descoberta durant l'anàlisi histopatològica d'un pacient ja que es va observar que presentava cúmuls de PrP^{Sc} que podrien remetre a CJD, però en canvi, no hi havia detecció de la proteïna priònica després del tractament amb PK (Figura 5F). Els pacients presenten psicosis, demència i problemes de parla i traspassen als 2 anys de mitjana (Zou *et al.*, 2010; Notari *et al.*, 2018).

Insomni Familiar Fatal esporàdic

Es tracta d'una fenocòpia del FFI genètic pel que fa a simptomatologia i la seva afectació talàmica. Se n'han descrit una trentena de casos fins al moment (Parchi *et al.*, 1999). El sFFI també se l'ha anomenat com una variant d'afectació talàmica de sCJD-MM2. La zona d'afectació va més enllà del tàlem i apareixent cúmuls a altres regions corticals (Cracco *et al.*, 2018).

1.4.4 Prionopaties adquirides

En aquests casos el pacient ha estat en contacte amb PrP^{Sc} preexistent que l'ha infectat. Representen menys de l'1% dels casos de Prionopatia, però la seva etiologia infectiva va suposar una alarma per als sistemes sanitaris mundials i l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (Bonda *et al.*, 2016; Turner, 2018). Poden ser d'origen zoonòtic, iatrogènic o per canibalisme.

Variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob

La variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) va aparèixer per primer cop al Regne Unit (Will *et al.*, 1996). És la variant zoonòtica del sCJD causada per la ingesta de material procedent de vaques amb Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE). Aquesta variant bovina de les Prionopaties va aparèixer al Regne Unit als vuitanta (Wells *et al.*, 1987). Deu anys més tard, van aparèixer casos de CJD que afectaven pacients molt joves amb una histopatologia diferent al sCJD (Figura 5E). Es van relacionar amb la epidèmia de BSE que havia sofert el país la dècada anterior. Actualment, se n'han descrit uns 250 casos, més del 75% dels quals al Regne Unit. A l'Estat espanyol se n'han diagnosticat 5 fins al moment. Es considera que tots els casos provenen de la epidèmia de BSE del Regne Unit sigui per la ingesta local o per la importació de vedella britànica (Brandel and Knight, 2018).

Tots els casos de vCJD presenten el polimorfisme 129MM, excepte un 129MV descrit recentment (Mok *et al.*, 2017). Aquest cas ha fet plantejar que podríem estar en una segona onada de vCJD de pacients amb 129MV i 129VV, ja que aquests polimorfismes haurien allargat el període d'incubació (Brandel and Knight, 2018; Scheckel and Aguzzi, 2018).

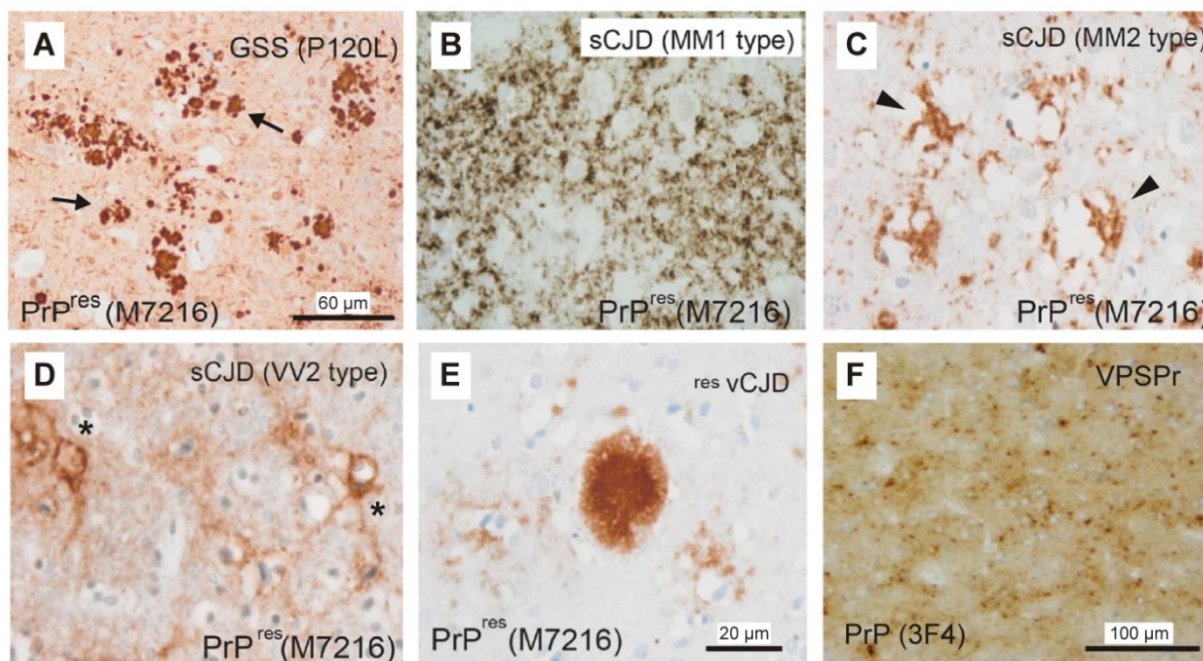


Figura 5: Anàlisi immunohistoquímica dels d'agregats de PrP^{Sc} en diferents subtipus de Prionopatia. A) Depòsits de PrP^{Sc} multicèntrics típics de la GSS (fletxes) en un cas relacionat amb la mutació P120L. B-D) Diferents disposicions d'agregats en sCJD: a nivell sinàptic en un cas MM1 (B), a nivell perivacuolar en un cas MM2 (triangles, C) i a nivell perineuronal en un VV2 (asterisc, D). E) Placa florida típica de la vCJD. F) Petits depòsits granulars i puntejats en la VPSPr. Totes les seccions són corticals. S'ha utilitzat l'anticòs M7216 a totes excepte a la F on s'ha emprat el 3F4. Adaptades de Del rio *et al*, 2018 (A-E) i de Notari *et al*, 2018 (F). Les imatges B-E comparteixen escala.

Malaltia de Creutzfeldt-Jakob iatrogènica

Fins al moment, s'han descrit uns 500 casos de la forma iatrogènica de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (iCJD). S'han relacionat amb la infecció derivada de diferents procediments mèdics: trasplantaments de duramàter, administració d'hormona del creixement cadavèrica, trasplantaments de còrnia, transfusions de sang i infecció per material quirúrgic contaminat. El primer cas fos descrit als setanta (Duffy *et al.*, 1974) i des de llavors s'han modificat els protocols de descontaminació del material quirúrgic, els criteris de selecció dels donants i s'ha introduït la leucoreducció universal de la sang per a transfusions en molts països. La seva clínica varia molt segons la font de la infecció (Bianchi *et al.*, 2016; Bonda *et al.*, 2016; Turner, 2018).

Kuru

Finalment, trobem el cas especial del Kuru. Es va descriure que moltes persones de la tribu Fore (Papua Nova Guinea) presentaven una malaltia neurodegenerativa endèmica sense explicació aparent (Gajdusek and Zigas, 1957). Estudis posteriors, van demostrar que la causa provenia dels rituals de canibalisme d'aquesta tribu amb els seus difunts. Els homes de la tribu ingerien la “millor” part del cos, els músculs, i, en canvi, els nens i les dones les vísceres i òrgans com el cervell. Això va ajudar a relacionar la ingesta del cervell com la causa de la malaltia ja que coincidia amb la part de la societat que preferentment la sofria (Klatzo *et al.*, 1959; Bonda *et al.*, 2016). El descobriment d'aquesta malaltia va iniciar la investigació en el camp de les Prionopaties i va permetre descriure l'origen comú entre el sCJD, el Kuru i la variant *scrapie* ovina (Asher and Gregori, 2018).

1.4.5 Diagnosi i teràpia de les Prionopaties

L'únic diagnòstic definitiu de les Prionopaties és la detecció de PrP^{Sc} per biòpsia o histopatologia *post mortem*. La gran heterogeneïtat clínica de les Prionopaties, la seva semblança amb altres malalties neurodegeneratives i la seva curta durada, fan difícil diagnòstic simptomatològic. Tot i això, la investigació ha fet molts avenços en els darrers anys per millorar la diagnosi amb la caracterització de nous biomarcadors i protocols de detecció de la PrP^{Sc}.

Biomarcadors per la diagnosi

Hi ha alguns patrons en l'electroencefalograma i en la ressonància magnètica característics de les Prionopaties. A més, s'utilitzen els nivells de les proteïnes 14-3-3 i p-Tau en el líquid cefaloraquídi (CSF) com a biomarcadors per al diagnòstic (Ironsides *et al.*, 2017). L'estudi de biomarcadors al CSF és un camp en creixement, de fet, recentment s'han descrit nivells elevats d' α -sinucleïna i de la cadena lleugera del neurofilament (NFL) en pacients de Prionopatia (Zerr *et al.*, 2017; Kanata *et al.*, 2018; Schmitz *et al.*, 2018).

Complementàriament, s'han implementat assajos d'amplificació de proteïna mal plegada (PrP^{Sc}) *ex vivo* seguint un procediment similar a la PCR de l'ADN. Actualment trobem dos procediments utilitzats en investigació bàsica: la *protein misfolding cyclic amplification* (PCMA) (Saborio *et al.*, 2001) i la *real-time quaking-induced conversion* (Rt-QuIC) (Wilham *et al.*, 2010). En els dos cassos, s'incuba la mostra on es vol testar la presència de PrP^{Sc} amb PrP^C recombinant o homogenat de cervell com a substrat. Cicles d'amplificació de l'agregació de PrP^{Sc} amb la PrP^C del substrat són alternats amb la disgregació dels

agregats generats per produir nous propagons i amplificar la senyal. Amb aquests cicles s'amplifica de forma exponencial la presència de la PrP^{Sc} i permetent la detecció de molt poques unitats de la PrP^{Sc} (Moda, 2017; Zerr *et al.*, 2017).

Amb aquests procediments s'ha millorat la detecció de PrP^{Sc} en comparació amb el mètode convencional per *Western Blotting*. Amb el PCMA s'ha aconseguit la detecció de la PrP^{Sc} en mostres de sang de pacients de vCJD i de mucosa del tracte olfactiu en sCJD (Moda, 2017). Amb la Rt-QuIC inclús s'ha validat amb mostres de CSF per la diagnosi de les Prionopaties amb quasi un 100% d'especificitat i un 85% de sensibilitat (Zerr *et al.*, 2017).

Tractaments

Pel que fa als tractaments, desafortunadament no podem comentar gaires avenços. La teràpia actual consisteix en medicació per controlar la simptomatologia i alleugerir el sofriment del pacient fins la defunció. Es va testar la Quinacrina (un fàrmac utilitzat per al tractament de la malària) en dos assajos clínics sense èxit (Collinge *et al.*, 2009; Geschwind *et al.*, 2013). Actualment no hi ha cap altre assaig clínic en curs que testï algun tractament per les Prionopaties (www.clinicaltrials.gov).

Hi ha algunes línies d'investigació que han donat resultats prometedors en models animals i potser es podrien testar en humans en uns anys. Aquestes ataquen la PrP^C endògena per intentar reduir la seva agregació amb molècules anti-prions (Diaz-Espinoza *et al.*, 2018) o amb anticossos (Polymenidou *et al.*, 2004; Herrmann *et al.*, 2015). Inclús hi ha un assaig clínic liderat pel Dr. Adriano Aguzzi (Universitat de Zurich, Suïssa) per obtenir mostres de pacients amb Prionopatia genètica per detectar anticossos anti-prions endògens. Actualment estem molt lluny de poder aconseguir alguna cura per les Prionopaties. Tot i que l'eliminació de la PrP^{Sc} arribés a ser factible, encara s'ha d'avançar molt en el diagnòstic perquè pogués ser una teràpia real. Es necessita primer assolir un nivell de diagnosi precoç, inclús asimptomàtic, per incidir en la malaltia abans de la simptomatologia perquè l'afectació del SNC ja està molt avançada.

2. Funcions fisiològiques de PrP^C

La PrP^C està evolutivament conservada en tots els vertebrats. Això ha fet pensar que aquesta proteïna ha d'exercir funcions rellevants que l'hagin preservat al llarg de l'evolució. Des del descobriment, s'ha estudiat el seu paper principalment en el SNC. No obstant, avui en dia, les seves funcions no estan totalment definides i no hi ha consens en el camp. S'han emprat molts models i protocols diferents per abordar aquesta matèria i això ha generat disparitat de resultats i una manca de reproductibilitat. L'estudi de les funcions fisiològiques de la PrP^C s'ha considerat molt rellevant per entendre les Prionopaties. Es considera que la simptomatologia d'aquestes malalties és conseqüència no només del guany de funció patològica degut al plegament anòmal i l'agregació de la PrP^{Sc}, sinó també de la pèrdua de funció fisiològica de la PrP^C. És a dir, es considera igualment important la degeneració i mort neuronal que causa la PrP^{Sc}, com la pèrdua de la funció nativa de la PrP^C (Westergard *et al.*, 2007; del Rio and Gavin, 2016; Wulf *et al.*, 2017).

En aquest apartat, es resumiran les funcions atribuïdes a la PrP^C per contextualitzar l'estat de la qüestió i intentar entendre els dèficits que pot ocasionar la seva disfunció al SNC dels pacients. En primer lloc, explicarem els models *in vivo* que s'han generat per estudiar aquesta proteïna, ja que han ocasionat molta controvèrsia en els darrers anys. A continuació, es parlarà de les funcions fisiològiques en què s'ha relacionat la PrP^C: a la sinapsi glutamatèrgica, en funcions cognitives com la memòria i l'aprenentatge, en la mielinització dels axons perifèrics; i en la diferenciació neuronal.

2.1 Models d'estudi de PrP^C

El 1992 es va generar el primer animal deficient per a la PrP^C (*Prnp*^{0/0}), el ratolí Zurich I (Büeler *et al.*, 1992). Des de llavors s'han descrit una desena més de models murins *Prnp*^{0/0} i altres que n'expressen formes truncades o d'altres mamífers. A més, s'han generat models genoanul·lats d'altres animals com la cabra, la vaca i el peix zebra. En aquest apartat es resumiran els més utilitzats.

2.1.1 Models animals no murins

Les Prionopaties que afecten al bestiar han estat motiu de preocupació per les autoritats sanitàries per la seva implicació en la cadena alimentària i el risc demostrat d'infecció zoonòtica als humans. A més, el ratolí no desenvolupa la Prionopatia de forma natural i estudiar-hi la biologia de la PrP^{Sc} allunya de la patologia real. Per això s'han desenvolupat models animals no murins per estudiar la BSE (vaca) i la malaltia *scrapie* (cabra).

S'ha generat un model boví deficient per a la PrP^C. Els seus extractes proteics de cervell no propaguen la Prionopatia *in vitro*, demostrant també que la PrP^C és indispensable per l'avenç de la malaltia (Richt *et al.*, 2007). La vaca és l'únic animal no humà, on s'ha descobert un cas de Prionopatia espontània relacionada amb una mutació, la E211K (homòloga a la E200K humana) (Richt and Hall, 2008).

En el cas de la cabra hi ha dos models *Prnp*^{0/0}: un generat per transgènesi (Yu *et al.*, 2009) i l'altre descobert a la natura amb un codó de terminació al gen *Prnp* (Benestad *et al.*, 2012). En l'estudi de l'*scrapie*, s'han invertit molts recursos per descobrir polimorfismes de *Prnp* que redueixin la susceptibilitat a la malaltia per reduir el risc d'infecció al bestiar (Aguilar-Calvo *et al.*, 2015). En aquests models, com en els bovins, els estudis de pèrdua de funció no han aportat pràcticament cap resultat. Es postula que no s'ha observat cap dèficit notori per les seves condicions d'estabulació i per la poca modulació experimental que permeten (Brunelle *et al.*, 2016).

Pel que fa a l'estudi de la biologia de PrP^C, hem de remarcar els models de peix zebra (*Danio rerio*). El peix zebra presenta dos gens ortòlegs al *Prnp* mamífer, el *Prp-1* i el *Prp-2* que s'expressen sobretot al SNC. La mida d'aquestes proteïnes és més gran que la variant dels mamífers, però la seva estructura presenta dominis similars (Cotto *et al.*, 2005). L'ús d'aquests models genoanul·lats ha relacionat la PrP^C amb: 1) neuroprotecció epilèptica i regulació dels receptors d'NMDA (Fleisch *et al.*, 2013); 2) adhesió cel·lular i desenvolupament (Solis *et al.*, 2013); i 3) aprenentatge i memòria (Leighton *et al.*, 2018).

2.1.2 Models de ratolí

Els ratolins s'han convertit en una de les eines principals en la recerca biomèdica, sobretot amb el desenvolupament dels primers ratolins transgènics als anys vuitanta (Gordon *et al.*, 1980). En el cas de les Prionopaties, disposem de ratolins que: 1) no expressen la PrP^C, 2) la sobreexpressen 3) n'expressen formes truncades, i 4) n'expressen variants d'altres mamífers.

Ratolins *Prnp*^{0/0}

Fa quasi tres dècades des de la generació del primer ratolí deficient per la PrP^C. Aquest model es va anomenar Zurich I (ZHI) per la ciutat on es va generar. Presenta un fons genètic mixt C57BL6/12Sv i també se l'anomena B6129-*Prnp*^{0/0}. En molts casos, s'ha retrocreuat diverses generacions amb animals C57BL6 (B6) purs per reduir el fons genètic d'origen 129Sv generant el model B6.129-*Prnp*^{0/0}. La primera caracterització va mostrar una anatomia normal i cap deficiència aparent (Büeler *et al.*, 1992). Aquest model va permetre demostrar que la presència de PrP^C és indispensable per adquirir la Prionopatia ja que és resistent a la patologia per infecció amb inòculs *scrapie* (Büeler *et al.*, 1993). Uns anys més tard, es va generar un nou ratolí genoanul·lat, el model l'Edinburgh (Edg) amb el fons genètic pur 129/Ola. En primer terme, aquest animal tampoc va mostrar dèficits cognitius ni del desenvolupament (Manson *et al.*, 1994). La manca de fenotip va plantejar que les funcions fisiològiques de la PrP^C eren redundants i estaven compensades per altres sistemes. Més endavant, altres estudis sí que han observat dèficits en aquests models en diverses funcions del SNC que més endavant s'explicaran.

Uns anys més tard, es van generar nous models *Prnp*^{0/0} amb la delecció total del gen, a diferència dels anteriors on només s'havia alterat un exó. El primer, anomenat Nagasaki, presentava un desenvolupament normal fins als 70 dies i, a partir de llavors, els animals sofrien atàxia i pèrdua de coordinació motora relacionada amb degeneració de les cèl·lules de Purkinje. Aquests resultats feien pensar que PrP^C jugava un paper principal en el manteniment i la supervivència d'aquestes cèl·lules. Els autors apuntaven a què aquest fenotip no s'havia observat en els models anteriors perquè no se'ls havia eliminat totalment el gen i postulaven que traduïen proteïnes truncades que eren suficients per prevenir la degeneració cerebelar (Sakaguchi *et al.*, 1996). Més endavant van rescatar el fenotip degeneratiu expressant *de novo* PrP^C, aparentment confirmant-ho (Nishida *et al.*, 1999).

La disparitat de resultats entre els models va obtenir resposta uns anys més tard. Es va descobrir que en el model Nagasaki i en un altre acabat de generar amb el mateix tipus de delecció, el Rmc0 (Moore, 1997), la degeneració cerebelar era deguda a la sobreexpressió de la proteïna Doppel i no a l'absència de la PrP^C. La transgènesi havia afectat a una regió d'iniciació d'*splicing* que conduïa a la sobreexpressió del gen *Prnd* que codifica per Doppel (Moore *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2001). Un tercer model generat en aquesta època, el Zurich II (ZHII) (Rossi *et al.*, 2001) també presentava degeneració cerebelar i atàxia relacionada a "l'efecte Doppel". Degut a això, el Nagasaki, l'Rmc0 i el ZHII van ser descartats.

L'efecte dels Flanking genes en els models murins Prnp^{0/0}

La controvèrsia sobre els models *Prnp^{0/0}* ha anat més enllà de "l'efecte Doppel". Recentment, s'ha descrit l'efecte dels "*Flanking genes*" en el model més emprat, el Zurich I, degut a un artefacte conseqüència de la transgènesi (Taula 2). Per generar aquest animal es va eliminar *Prnp* a una cèl·lula mare embrionària amb fons genètic 129/Sv. Aquestes cèl·lules es van implantar a una femella C57BL6. Això va fer que, tot i el retrocreuament de la descendència amb animals C57BL6 purs, l'animal ZHI-*Prnp^{0/0}*, però no el ZHI-*Prnp^{+/+}*, presenti gens procedents del fons 129/Sv flanquejant la deleció de *Prnp*, els anomenats *Flanking genes*. Per tant, els animals difereixen en l'expressió de la PrP^C i també amb els polimorfismes de les proteïnes codificades per aquests gens flanquejants, concretament se'n van descriure 62 d'afectats (Nuvolone et al., 2013). A la mateixa publicació s'observa que la regulació de la fagocitosi atribuïda a PrP^C (de Almeida et al., 2005), en realitat la du a terme un d'aquests gens, el *Sirpa*. El polimorfisme *Sirpa^{129/Sv}* de l'animal ZHI-*Prnp^{0/0}* presenta més capacitat fagocítica que el polimorfisme *Sirpa^{C57BL6/J}* que trobem en el ZHI-*Prnp^{+/+}*, independentment de l'expressió de la PrP^C (Nuvolone et al., 2013).

L'efecte dels *Flanking genes* també afecta a tots els models que en deriven, com el FVB/N-*Prnp^{0/0}* que es van generar creuant animals d'expressió salvatge FVB amb el ZHI (Lledo et al., 1996). La majoria de models de sobreexpressió de la PrP^C i de les seves formes truncades s'han generat també a partir del model ZHI. El fenomen dels *Flanking genes* ha posat en dubte els resultats obtinguts amb aquests models i necessitarien ser revaluats (Nuvolone et al., 2013). Es considera una de les causes principals de la falta de reproductibilitat en els estudis de la funció fisiològica de la PrP^C.

El model Edg, i en general els ratolins amb fons 129/Ola, presenten problemes ja que tenen poca descendència i les ventrades són reduïdes. Per això un grup es va retrocreuar aquest model amb ratolins C57BL10 i es va generar un altre ratolí genoanul·lat, el C57BL10/SnJ (Criado et al., 2005). Utilitzant aquest model s'ha relacionat la PrP^C amb la recaptació de glutamat pels astròcits (Pathmajeyan et al., 2011) i amb l'adquisició de memòria espacial i la potenciació a llarg termini (LTP) (Criado et al., 2005). Aquests resultats necessitarien ser també revaluats degut a la presència de gens amb fons 129/Ola. Els propis autors apunten en un treball del 2013 que l'animal *Prnp^{0/0}*, però no el *Prnp^{+/+}*, presenta 47,4Mb del genoma provinents del fons 129/Ola. Postulen que el paper neuroprotector de PrP^C enfront la inducció epilèptica recauria en aquests gens flanquejants i no en l'absència de la PrP^C (Striebel et al., 2013b).

Nous models murins *Prnp*^{0/0}

En aquest context apareix el que es postula com el model murí *Prnp*^{0/0} “definitiu”, el Zurich III (ZH3). Aquest animal s’ha generat per tecnologia TALEN sota el model co-isogènic C57BL6/J. Només s’han eliminat 8 parells de bases generant un codó de terminació a l’exó 3. Això modifica mínimament el genoma i, pel que s’ha descrit fins ara, no provoca cap alteració transcriptòmica al voltant de la mutació (Nuvolone *et al.*, 2016). Emprant aquest model, s’ha tornat a observar que la PrP^C participa en l’homeòstasi de la mielina en el sistema nerviós perifèric (SNP) (Kuffer *et al.*, 2016).

La tecnologia Cre-loxP permet generar animals amb transgènesi dirigida tant espacialment com temporal. En el cas de la PrP^C, s’ha utilitzat per defugir dels mecanismes compensatoris durant el desenvolupament i així desemascarar-ne el paper real. Per una banda, trobem els models Tg37 i Tg46 que s’han creuat amb en ratolí que expressa la recombinasa Cre sota el promotor de la cadena pesada del neurofilament eliminant *Prnp* a les neurones madures (Mallucci *et al.*, 2002; Mallucci *et al.*, 2003). Un altre grup ha generat dos altres models, “On” i “Off” a partir del model Edg. En el primer, l’acció de la Cre inicia la transcripció de *Prnp*, i en l’altre actua a l’inrevés (Tuzi *et al.*, 2004; McCulloch *et al.*, 2013). Aquests darrers models, tot i ser una eina prometedora, no s’han compartit pràcticament amb la comunitat científica. Això ha fet que, de moment, n’hagin derivat poques publicacions.

Model	Referència	Fons genètic	Efecte Doppel	Flanking genes
Zurich I (ZHI)*	(Büeler <i>et al.</i> , 1992)	C57BL6 x 129/Sv o B6129	No	Sí
Edimburg (Edg)*	(Manson <i>et al.</i> , 1994)	129/Ola	No	No
FvB/N*	(Lledo <i>et al.</i> , 1996)	C57BL6 x 129/Sv x FvB	No	Sí
Nagasaki	(Sakaguchi <i>et al.</i> , 1996)	C57BL6 x 129/Sv	Sí	Sí
Rcm0	(Moore, 1997)	C57BL6 x 129/Sv	Sí	Sí
Zurich II (ZHII)	(Rossi <i>et al.</i> , 2001)	C57BL6 x 129/Sv	Sí	Sí
C57Bl10/SnJ	(Criado <i>et al.</i> , 2005)	C57Bl10/SnJ x 129/Ola	No	Sí
Zurich III (ZH3)*	(Nuvolone <i>et al.</i> , 2016)	C57BL6	No	No

Taula 2: Models de ratolí amb deleció constitutiva de *Prnp*. Es mostra el seu fons genètic i si presenten “l’efecte Doppel” (sobreexpressió aberrant de Doppel) i dels *Flanking genes* (polimorfismes d’origen 129Sv flanquejant la deleció de *Prnp*). Marcats amb un asterisc els models utilitzats en aquesta tesi.

En resum, després de trenta anys d'investigació sobre la PrP^C amb models de ratolí, el camp necessita discernir entre les funcions reals de la PrP^C i les que se li han assignat erròniament degut als artefactes generats per la transgènesi i a l'ús de diferents models amb fons genètics mixtes. La generació de l'animal ZH3 i dels models Cre-loxP-*Prnp* prometen aportar una mica de llum en aquest sentit.

Models murins de sobreexpressió de PrP^C

Per intentar confirmar els resultats obtinguts amb el model *Prnp*^{0/0} s'hi va reintroduir l'expressió de la PrP^C per rescatar el fenotip. El model de sobreexpressió més utilitzat és el *Tga20* que expressa la PrP^C 4-6 cops més que un animal salvatge. Es va generar a sobre del ZH1 i, per tant, presenta els *Flanking genes* (Fischer *et al.*, 1996). L'excés d'expressió de la PrP^C condueix a la seva acumulació no funcional mostrant un fenotip similar al de l'animal *Prnp*^{0/0}. Aquests models de sobreexpressió presenten una elevada excitabilitat neuronal (Rangel *et al.*, 2009) i un fenotip degeneratiu en edats avançades (Westaway *et al.*, 1994b).

Ratolins amb expressió truncada de PrP^C

S'han generat models murins que sobreexpressen formes truncades de la PrP^C per estudiar les funcions de cada domini. Trobem el model *Prnp*^{0/0}ΔF35, que expressa només el domini alfa-globular (Δ32-134) i el *Prnp*^{0/0}ΔC4 que li manca el domini OR (Δ94-134) (Shmerling *et al.*, 1998; Flechsig *et al.*, 2000). També se n'han generat sense el domini GPI per elucidar la rellevància de l'ancoratge a membrana per l'avenç de la malaltia (Chesebro *et al.*, 2005; Race *et al.*, 2017).

Ratolins amb expressió de PrP^C d'altres mamífers

Finalment, s'han generat models de ratolí deficientes per a la PrP^C murina on s'ha sobreexpressat la PrP^C d'una altre animal. S'utilitzen per estudiar la infectivitat de les diferents soques de prió, intentar reproduir la infectivitat "espontània" i estudiar la barrera infectiva entre espècies. Entre desenes de models, per exemple, trobem ratolins que expressen mutacions concretes de la PrP^C humana que cursen amb Prionopaties familiars (Brandner and Jaunmuktane, 2017).

2.2 PrP^C: Regulació de la fisiologia sinàptica

Des del descobriment de la PrP^C s'ha posat el focus en el seu rol en la sinapsi excitatòria. S'ha descrit que participa en la neurotransmissió i en processos excitotòxics. En aquest apartat s'explicaran coneixements bàsics per poder entendre les funcions en les que s'ha relacionat la PrP^C. S'explicarà com funciona la sinapsi glutamatèrgica, els seus receptors i que són l'excitabilitat i l'excitotoxicitat neuronal.

2.2.1 La sinapsi

El terme sinapsi va ser encunyat per Sherrington ja fa més d'un segle (Sherrington, 1906). Va ser el primer en enllaçar la connexió anatòmica entre dues neurones amb la seva funcionalitat. A més, va aportar un coneixement bàsic que ajudaria a resoldre el conflicte conceptual entre la *teoria reticular* de Camillo Golgi i la *doctrina neuronal* de Santiago Ramón i Cajal. El primer pensava que tot el SNC estava format per una única xarxa continua i el segon, per cèl·lules discretes. La postulació de la sinapsi com la unió fisiològica va ajudar a confirmar la teoria de la *doctrina neuronal* ja que demostrava que les cèl·lules estaven separades (Burke, 2007).

La sinapsi és la regió de contacte especialitzat de les neurones que permet la propagació de l'impuls nerviós. La connexió majoritària és entre neurones, però també es poden connectar a altres cèl·lules com astròcits o cèl·lules musculars. La senyal que transmet és majoritàriament química (neurotransmissors) tot i que també hi ha sinapsis elèctriques on la connexió implica compartició del citoplasma i moviment d'ions entres les dues neurones (Kandel *et al.*, 2012). És una estructura totalment polaritzada amb un terminal presinàptic a la neurona emissora i un terminal postsinàptic a la neurona receptora separats per la fenedura sinàptica. A grans trets, una sinapsi química funciona en tres passos: 1) l'arribada d'un potencial d'acció al terminal presinàptic que despolaritza la membrana i provoca una entrada massiva de Ca²⁺ pels canals dependents de voltatge; 2) l'alliberament de neurotransmissors a la fenedura sinàptica per l'augment local de Ca²⁺ que ha promogut la fusió de les vesícules presinàptiques que els emmagatzemen; i 3) la unió específica dels neurotransmissors als receptors del terminal postsinàptic. Això desencadena un canvi en el potencial de membrana generant potencials excitatoris (EPSP) o inhibitoris (IPSP) (Kandel *et al.*, 2012).

Les característiques de cada sinapsi depenen dels neurotransmissors que s'alliberin i dels receptors del terminal postsinàptic. Poden ser excitatòries o inhibidores si despolaritzen o hiperpolaritzen el terminal postsinàptic, respectivament. El nombre exacte de neurotransmissors diferents no es coneix, però se n'han descrit més d'un centenar. Es classifiquen en dos grups: en molècules petites (sobretot AA i monoamines) i en neuropèptids. Entre els aminoàcids els més freqüents són el glutamat, l'àcid γ-aminobutíric (GABA) i la glicina. La noradrenalina, la adrenalina, la serotonina i la dopamina són les monoamines més rellevants. Pel que fa als pèptids se n'han descrit algunes desenes com la substància P i els opioides (Kandel *et al.*, 2012).

2.2.2 El glutamat i els receptors glutamatèrgics

Fins a la dècada dels cinquanta del segle XX no es va descriure el paper en la sinapsi excitatòria del glutamat (Hayashi, 1952). La majoria de les sinapsis excitatòries del SNC presenten aquest aminoàcid com a principal neurotransmissor. Té un paper important en processos fisiològics com la plasticitat sinàptica i l'LTP. Suposen el 80-85% de totes les sinapsis al SNC, així doncs la seva desregulació es relaciona amb la clínica neurodegenerativa de moltes patologies (Beart and O'Shea, 2007; Platt, 2007). A continuació, s'explicarà la síntesi i el reciclatge d'aquest neurotransmissor i la importància dels astròcits en aquests processos. S'introduiran també els dos tipus de receptors glutamatèrgics: els ionotòpics (iGluRs) i els metabotòpics (mGluRs) (Kandel *et al.*, 2012).

Síntesi del glutamat i el seu reciclatge

La font principal de glutamat per la neurotransmissió prové del cicle glutamina-glutamat entre els astròcits i les neurones. El glutamat després de la neurotransmissió és recaptat pels astròcits, convertit a glutamina i retornat de nou a les neurones que el tornen a convertir a glutamat per iniciar de nou el cicle (Daikhin and Yudkoff, 2000; Tzingounis and Wadiche, 2007).

El glutamat és alliberat a la fenedura sinàptica degut a la despolarització del terminal presinàptic. Un cop s'ha unit als receptors postsinàptics, els transportadors específics del glutamat (EEATs) el recapten de la fenedura. Aquesta recaptació la fan majoritàriament els astròcits adjacents a la sinapsi, tot i que una petita part també és recaptada per les neurones del terminal. S'han descrit 5 transportadors de glutamat: els EEAT1-2 que són glicals i els EEAT3-5 neuronals (Beart and O'Shea, 2007; Tzingounis and Wadiche, 2007).

Als astròcits el glutamat recaptat és convertit en glutamina la qual és recaptada per les neurones via transportadors dependents i independents de Na⁺. La glutamina és convertida a glutamat al mitocondri de la neurona per la glutaminasa. Després, el transportador de glutamat vesicular (Vglut1) l'internalitza a les vesícules presinàptiques per alliberar-ho de nou (Daikhin and Yudkoff, 2000; Tzingounis and Wadiche, 2007).

Aquest cicle és la font primària de glutamat per la sinapsi tot i que aquest aminoàcid també pot ser generat a partir d'un dels intermediaris del cicle de Krebs, l'alfa-ketoglutarat. A més, pot ser oxidat i entrar al propi cicle de Krebs per obtenir energia. Es considera que aquest mecanisme s'ha conservat evolutivament perquè: 1) redueix l'exposició del glutamat a la fenedura sinàptica per prevenir la sobreactivació; 2) utilitza de missatger la glutamina que no és activa en el terminal sinàptic prevenint l'activació inespecífica del terminal; 3) proveeix a la neurona no només el precursor d'un neurotransmissor, sinó un metabòlit que pot ser emprat en altres vies metabòliques i com a font energètica; i 4) tampona els possibles excessos d'amoni del SNC potencialment neurotòxic (Daikhin and Yudkoff, 2000).

Receptors Ionotròpics

S'han definit tres tipus de iGluRs farmacològicament i funcional. S'anomenen segons els seus agonistes principals: 1) receptor d'α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionat (AMPA); 2) receptor d'N-metil-D-aspartat (NMDA); i 3) receptor de 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina o, també anomenat, àcid kaínic (KA). Aquesta classificació no s'ajusta totalment a la realitat ja que s'ha descrit activació creuada entre ells. Tots els receptors són tetràmers i les subunitats que els formen caracteritzen la seva funció. Són canals catiónics no selectius permeables a Na⁺ i K⁺, i amb més o menys afinitat al Ca²⁺ (Meldrum, 2000; Platt, 2007).

Aquests receptors tenen estructures similars però presenten cinètiques d'activació diferents. Això confereix a les sinapsis diferents tipus d'activació segons la combinació de receptors que expressen. La majoria de terminals glutamatèrgics presenten majoritàriament una barreja de receptors AMPA i NMDA (Iacobucci and Popescu, 2017).

- Els receptors AMPA

Els receptors AMPA són els responsables de la transmissió excitatòria més ràpida i majoritària del SNC. Les seves característiques fisicoquímiques fan que s'activin els primers a la sinapsi i decauen determinant l'amplitud del EPSP que es genera al terminal. S'expressen tant a neurones com a la glia al llarg de tot el SNC. Presenten dos regions d'unió al glutamat (Tzingounis and Wadiche, 2007).

Estan formats majoritàriament per heterotetràmers, tot i que també trobem homotetràmers. Poden presentar combinacions diferents de quatre subunitats codificades pels gens *GluA1*, *GluA2*, *GluA3* i *GluA4* (tradicionalment anomenats GluR1, GluR2, GluR3 i GluR4, respectivament) (Henley and Wilkinson, 2016) (Taula 3). Hi ha autors que descriuen que la majoria de receptors AMPA estarien formats per dues subunitats de GluA1 i dues de GluA2 (Lu *et al.*, 2009), i d'altres parlen les parelles GluA1-GluA2 i GluA2-GluA3 com igual de freqüents (Wentholt *et al.*, 1996). Independentment de la composició del tetràmer, hi ha consens en què la subunitat GluA2 està present a la majoria de receptors. La subunitat GluA4 s'expressa sobretot durant el desenvolupament a l'hipocamp i desapareix a les poques setmanes (Zhu *et al.*, 2000).

Totes les subunitats presenten la mateixa estructura amb el domini N-terminal extracel·lular (on s'uneix el glutamat), tres dominis transmembrana i la part C-terminal intracel·lular. El domini C-terminal és variable i actua com a plataforma per la interacció amb altres proteïnes i modificacions post-traduccionals que regulen la seva funció. La subunitat GluA1 és fosforilada per la *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMKII) reclutant-la al terminal sinàptic induint la generació de la LTP (Hayashi *et al.*, 2000). També és important la modificació Q607R de la subunitat GluA2 que modifica l'activitat del canal modificant la seva permeabilitat al Ca^{2+} (Sommer *et al.*, 1991).

- Els receptors NMDA

Són canals dependents de voltatge i estan fisiològicament bloquejats per cations Mg^{2+} . L'activació inicial dels receptors d'AMPA despolaritza el terminal fent sortir el Mg^{2+} que permet la seva obertura i l'entrada de Na^+ . Necessiten també la unió amb la glicina per obrir-se (Cummings and Popescu, 2015). Influeixen en la càrrega positiva que entra al terminal i la duració de la despolarització.

Estan formats per heterotetràmers a partir de catorze tipus de subunitats. Aquestes són codificades per set gens diferents: *GluN1* (per *splicing* alternatiu genera 8 subunitats diferents), *GluN2A*, *GluN2B*, *GluN2C*, *GluN2D*, *GluN3A* i *GluN3B* (Paoletti *et al.*, 2013) (Taula 3). La subunitats concretes que formen els heterotetràmers no estan definides ja que la seva expressió es solapa i hi coexisteixen moltes combinacions. Es considera clar només que als heterotetràmers hi ha com a mínim una subunitat GluN1 i una GluN2. La GluN1 s'expressa en totes les neurones des del principi del desenvolupament. La GluN2B i la GluN2D s'expressen en l'estadi embrionari, i la GluN2A i la GluN2C comencen a expressar-se després del naixement. A l'hipocamp adult, la GluN2A i la GluN2B s'expressen notòriament a les cèl·lules piramidals de CA1 i CA3, en canvi, la GluN2C i la GluN2D s'expressen en diferents tipus d'interneurones (Monyer *et al.*, 1994).

Els receptors NMDA presenten una estructura similar als receptors AMPA amb un domini N-terminal extracel·lular on s'uneixen els lligants, una regió C-terminal intracel·lular que interactua amb varies proteïnes citoplasmàtiques i dominis transmembrana (Iacobucci and Popescu, 2017).

- *Els receptors KA*

Estan formats també per tetràmers. En aquest cas trobem cinc subunitats diferents: GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 i GluK5 (anomenats originalment GluR5, GluR6, GluR7, KA1 i KA2 respectivament) (Taula 3). S'han descrit diverses modificacions d'*splicing* alternatiu de les subunitats GluK1-3 que n'amplien el repertori. Les subunitats GluK1-3 formen homo i heterotetràmers funcionals en solitari, en canvi, les GluK4 i GluK5 necessiten coexpressar-se amb alguna de les anteriors per formar receptors funcionals. Presenten una estructura amb els mateixos dominis que els receptors AMPA i NMDA (Lerma and Marques, 2013; Carta *et al.*, 2014).

Els receptors KA s'expressen al llarg del SNC, notòriament a les sinapsis de: 1) les fibres molsoses amb les neurones piramidals de la CA3; 2) les fibres col·laterals de Schaffer i les interneurons de la CA1; 3) les fibres paral·leles amb les neurones de Golgi al cerebel; 4) a la de la connexió talàmico-cortical; i 5) a les fibres aferents sensorials amb la medulla espinal. Presenten una distribució específica majoritària d'algunes de les subunitats. La GluK2 s'expressa a les neurones piramidals de l'escorça i l'hipocamp (CA1 i CA3) i a les granulars del cerebel. La GluK1 a les interneurons hipocàmiques i corticals i a les neurones de Purkinje. La GluK3 s'expressa sobretot al gir dentat hipocàmpic i al neocòrtex. La GluK4 a la capa piramidal de CA3 i al DG (Wisden and Seeburg, 1993; Lerma and Marques, 2013; Carta *et al.*, 2014).

Exerceixen tres rols principals en el SNC: 1) desencadenar l'activació inicial les sinapsis excitatòries, tot i que en la majoria de sinapsis són els receptors d'AMPA els que realitzen aquesta funció; 2) modular l'alliberament de neurotransmissors excitatoris i inhibitoris actuant a nivell presinàptic; i 3) regular la maduració de les xarxes neuronals durant el desenvolupament (Kerchner *et al.*, 2001; Lerma and Marques, 2013).

Aquests receptors presenten dues particularitats respecte als altres iGluRs. En primer lloc, l'obertura dels canals requereix l'activació al·lostèrica per unió de cations Na⁺ i anions monovalents Cl⁻. Quan una sinapsi està sobreactivada, la concentració de Na⁺ a la fenedura sinàptica cau ràpidament fent que els receptors de KA no es puguin activar. Això és un mecanisme de neuroprotecció sinàptic contra el dany per excitotoxicitat (Bowie, 2002; Plested and Mayer, 2007). A més a més, aquest receptor no actua només ionotàcticament,

sinó també metabotrópica senyalitzant via proteïna G i altres missatgers secundaris. Aquest fenomen s'ha descrit al terminal presinàptic de neurones inhibidores de la regió CA1 hipocàmpica i del gangli de l'arrel dorsal modulant l'alliberament de GABA (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2000).

Receptors metabotrópics

Els mGluRs són receptors lligats a proteïna G (GPCR) tipus C. S'han descrit vuit gens diferents que els codifiquen i s'han agrupat en tres grups segons els seus missatgers secundaris, la seva homologia filogenètica i la farmacologia dels seus agonistes i antagonistes (Taula 3). Degut a l'*splicing* dels gens que codifiquen pels mGluRs tipus I, es generen una desena d'isoformes més (Ferraguti *et al.*, 2008). El grup I (mGlu1 i mGlu5) està associat a proteïna G_{αq} que activa la fosfolipasa C (PLC) incrementant el nivell de Ca²⁺ intracel·lular, fet que activa la proteïna cinasa K (PKC). El grup II (mGlu2 i mGlu3) i el grup III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 i mGlu8) estan associats a proteïna G_i/G_o i inhibeixen l'adenilat ciclasa la qual redueix la concentració d'AMP cíclic que inhibeix la proteïna cinasa A (PKA). Aquestes vies són les majoritàries dels receptors, no obstant s'ha descrit la seva participació en l'activació d'altres missatgers secundaris (Platt, 2007; Ferraguti *et al.*, 2008; Willard and Koochekpour, 2013).

Els tres tipus es troben tant a les dues bandes del terminal. Els grups II i III comparteixen via de senyalització però difereixen en la seva localització subcel·lular. Els de tipus III estan localitzats a les zones actives del terminal i els altres allunyats. En general, tots els mGluRs s'expressen a les neurones de forma ubiqua al SNC, excepte l'mGlu6 que s'expressa exclusivament a la retina i l'mGlu3 i l'mGlu5 que s'expressen també a la glia (Mazzitelli *et al.*, 2018; Suh *et al.*, 2018).

Com tots els GPCRs, estan formats per 7 dominis transmembrana que formen 3 *loops* extracel·lulars i 3 *loops* intracel·lulars. El domini N-terminal extracel·lular presenta una regió d'unió al glutamat. El domini intracel·lular C-terminal modula l'activitat del receptor amb el seu lligand i la proteïna G. Aquesta regió és diana de regulació per fosforilació i per interacció directa proteïna-proteïna (Scheefhals and MacGillavry, 2018).

La funció dels mGluRs és modular l'excitabilitat neuronal i l'alliberació de neurotransmissors com el propi glutamat o el GABA. Actuen als dos terminals de la sinapsi modulant l'activitat neuronal mitjançant múltiples vies de senyalització i l'obertura de canals iònics per modificar el potencial de membrana. Participen en la generació de la depressió a llarg termini (LTD), la plasticitat neuronal i el reciclatge i trànsit vesicular d'altres receptors (Suh *et al.*, 2018).

Receptors ionotòpics			Receptors metabotròpics		
AMPA	NMDA	KA	Tipus I	Tipus II	Tipus III
GluA1 (GluR1)	GluN1	GluK1 (GluR5)	mGlu1	mGlu2	mGlu4
GluA2 (GluR2)	GluN2A	GluK2 (GluR6)	mGlu5	mGlu3	mGlu6
GluA3 (GluR3)	GluN2B	GluK3 (GluR7)			mGlu7
GluA4 (GluR4)	GluN2C	GluK4 (KA1)			mGlu8
	GluN2D	GluK5 (KA2)			
	GluN3A				
	GluN3B				

Taula 3: Resum dels receptors ionotòpics i metabotròpics de glutamat. Entre parèntesis es presenta la nomenclatura clàssica.

2.2.3 Excitabilitat, excitotoxicitat i epilèpsia

Excitabilitat neuronal

Les neurones presenten sobretot dues característiques generals que les diferencien dels altres tipus cel·lulars: la seva gran polarització i l'excitabilitat activa. La polarització es refereix a la compartimentació i la divisió subcel·lular de les neurones. Aquests genera, a grans trets, tres regions amb diferències estructurals, moleculars i funcionals: el soma, les dendrites i els axons. L'excitabilitat recau en la seva capacitat d'interpretar i produir senyals elèctriques per comunicar-se amb altres cèl·lules. Aquesta excitabilitat ve donada pel potencial de membrana generat pels canals iònics que mantenen de forma basal una càrrega negativa intracel·lular. La resposta que genera una neurona prové en la integració de les múltiples senyals excitatòries i inhibidores que rep; si aquest sumatori supera el llindar d'activació, es despolaritzarà generant un potencial d'acció (Kandel *et al.*, 2012).

L'excitabilitat de la neurona, i, per tant, la seva activitat, depèn dels receptors de neurotransmissors, dels canals iònics depenent de voltatge i de la maquinària de proteïnes que estabilitza i regula el terminal sinàptic. Si alguna d'aquestes parts està alterada pot afectar no només a la transmissió, sinó inclús provocar danys cel·lulars degut a l'excitotoxicitat.

Excitotoxicitat i mort neuronal

L'excitotoxicitat fou descrita observant els efectes tòxics derivats de l'estimulació excessiva dels receptors de glutamat (Olney, 1969). Aquest fenomen depèn de la sobreestimulació dels receptors de glutamat. Pot ser un excés d'alliberació del neurotransmissor, la disfunció de la recaptació o la dessensibilització dels receptors. L'excitotoxicitat està relacionada amb la patogènia de malalties neurològiques com l'ictus, l'epilèpsia i algunes malalties neurodegeneratives com la corea de Huntington, la malaltia de Parkinson i la malaltia d'Alzheimer (Lerma and Marques, 2013; Ambrosi *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2014; Pallo *et al.*, 2016).

En condicions normals, el glutamat és reabsorbit pels astròcits i neurones després de l'alliberament presinàptic via els EEATs conjuntament amb Na⁺ (O'Kane *et al.*, 1999). Quan aquest sistema falla perquè hi ha massa glutamat a la fenedura sinàptica o hi ha alguna alteració, es sobreactiva el terminal postsinàptic degut a una obertura excessiva sobretot dels receptors d'NMDA. Això provoca una entrada massiva de Ca²⁺ seguida d'un moviment de Cl⁻ i aigua. A curt termini provoca un augment de volum del terminal postsinàptic (Jia *et al.*, 2015).

A més, el Ca²⁺ internalitzat activa diferents vies que acabaran provocant la mort neuronal per excitotoxicitat (Figura 6). Els receptors NMDA i l'influx de Ca²⁺ activen la sintasa d'òxid nítric (NOS) generant òxid nítric (NO). El NO genera espècies oxidants com el peròxid nítric (ONOO⁻) que poden causar oxidació de proteïnes, dany a l'ADN i peroxidació lipídica (Jones, 2011). El Ca²⁺ activa també proteases dependents de Ca²⁺, com la Calpaïna o les Caspases, i cinases com la CaMKII. Això acaba despolaritzant la membrana mitocondrial i activa vies de senyalització i factors de transcripció contribuint a la mort cel·lular per necrosi o apoptosi. Finalment, també es genera dany cel·lular mitjançant les espècies reactives d'oxigen (ROS) que genera el mitocondri degut a l'excés de Ca²⁺ (Jia *et al.*, 2015).

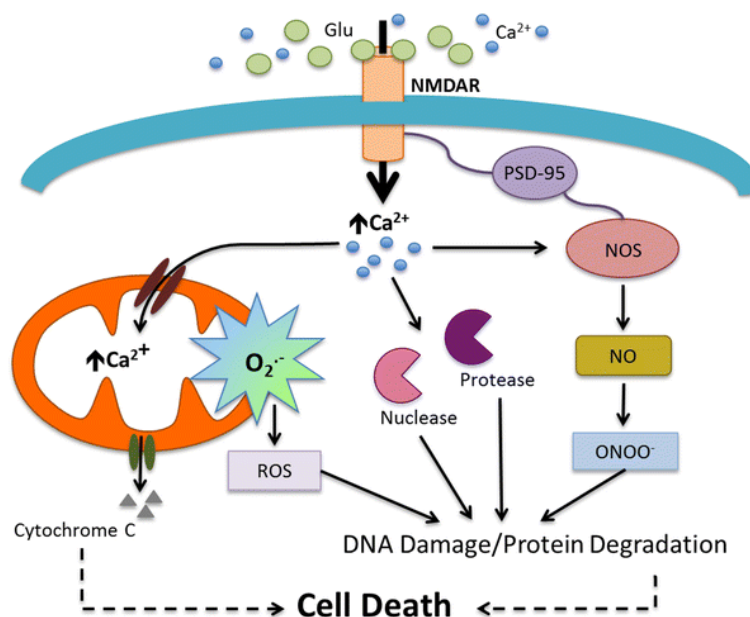


Figura 6: Efectes de l'entrada massiva de Ca^{2+} que condueixen a la mort neuronal per excitotoxicitat. L'elevada concentració de Ca^{2+} activa diferents nucleases i proteases i genera ROS i ONOO^- . Aquestes vies convergeixen provocant mort cel·lular. Imatge obtinguda de Jia *et al.*, 2015.

2.2.4 Funcions de PrP^C a la sinapsi glutamatèrgica i els seus receptors

La PrP^C s'expressa especialment al SNC, sobretot a les neurones, tot i que també la trobem a la glia. S'ha descrit l'expressió de PrP^C al terminal presinàptic (Hermes *et al.*, 1999), al postsinàptic (Um *et al.*, 2012) i al llarg dels axons del SNC i del SNP (Borchelt *et al.*, 1994). La seva expressió sinàptica va fer plantejar la implicació de PrP^C en la transmissió sinàptica i la plasticitat. Tot i els més de 30 anys d'estudi en aquest camp, el rol de PrP^C a la sinapsi no està totalment definit. En aquest apartat es resumiran els resultats més rellevants que s'han publicat al respecte i amb quins elements de la sinapsi se l'ha relacionat (Figura 7). S'han descrit molts resultats contradictoris en aquest camp per l'ús de models animals i aproximacions experimentals diferents que no permeten assignar clarament un paper a PrP^C en aquest sistema (Wulf *et al.*, 2017).

Interacció de PrP^C amb canals iònics dependents de voltatge

Actualment es considera que la funció sinàptica de PrP^C recau principalment en la seva interacció amb altres proteïnes del terminal. S'ha descrit que PrP^C interactua amb la proteïna DPP6 (*dipeptidyl peptidase-like 6*) i aquesta interactua amb el canal de K^+ dependent de voltatge 4.2 (Kv4.2). Aquesta interacció redueix l'excitabilitat sinàptica modulant l'obertura i tancament del canal Kv4.2 (Mercer *et al.*, 2013). També s'ha descrit

que interacciona amb una subunitat dels canals de Ca²⁺ dependents de voltatge (VGCCs) regulant-ne la seva expressió al terminal (Senatore *et al.*, 2012). La modulació d'aquests canals s'ha relacionat amb la reducció de la hiperpolarització lenta posterior (sAHP) descrita a l'hipocamp (Mallucci *et al.*, 2002; Fuhrmann *et al.*, 2006) i al cerebel (Herms *et al.*, 2000) dels ratolins ZHI-*Prnp*^{0/0}. La sAHP es produeix per un tren de potencials d'acció repetits que hiperpolaritzen el terminal prevenint la generació de potencials d'acció subseqüents. Per tant, la reducció de la sAHP en el model *Prnp*^{0/0} implica més excitabilitat neuronal. Aquesta disminució de la sAHP s'ha relacionat també amb PrP^C per la seva possible regulació de l'homeòstasi del Ca²⁺ al reticle endoplasmàtic postsinàptic (Powell *et al.*, 2008).

Modulació dels receptors glutamatèrgics

Diferents autors han apuntat, no sense controvèrsia, que la PrP^C regularia directament els receptors glutamatèrgics i la seva excitabilitat. En aquest sentit, s'ha descrit tant que les sinapsis *Prnp*^{0/0} són més excitable (Fan *et al.*, 2016) com que tenen un llindar d'activació epilèptica superior (Ratte *et al.*, 2011). S'ha observat que la PrP^C interactua amb la subunitat GluN2D dels receptors NMDA (Khosravani *et al.*, 2008). Aquesta relació es descriu en un altre treball on s'observa una recuperació del fenotip depressiu del ratolí *Prnp*^{0/0} tractant-lo amb un antagonista dels receptors NMDA (Gadotti *et al.*, 2012). A més, s'ha descrit que s'uneix als receptors d'NMDA dependentment de Cu²⁺ reduint la seva afinitat per la glicina. La reducció d'aquesta de la unió produeix una insensibilització dels receptors d'NMDA en presència excessiva de glutamat o NMDA protegint la sinapsi de l'entrada massiva de Ca²⁺ (You *et al.*, 2012) (Figura 7).

La PrP^C també s'ha relacionat amb els receptors AMPA. S'ha descrit que coimmunoprecipita amb les subunitats GluA1 i GluA2 (Watt *et al.*, 2012). Finalment, s'ha observat que la PrP^C s'uneix al receptors mGluR5 modulant la seva senyalització en el context de la malaltia d'Alzheimer (Beraldo *et al.*, 2011) i també l'homeòstasi del Ca²⁺ sinàptic (De Mario *et al.*, 2017) (Figura 7).

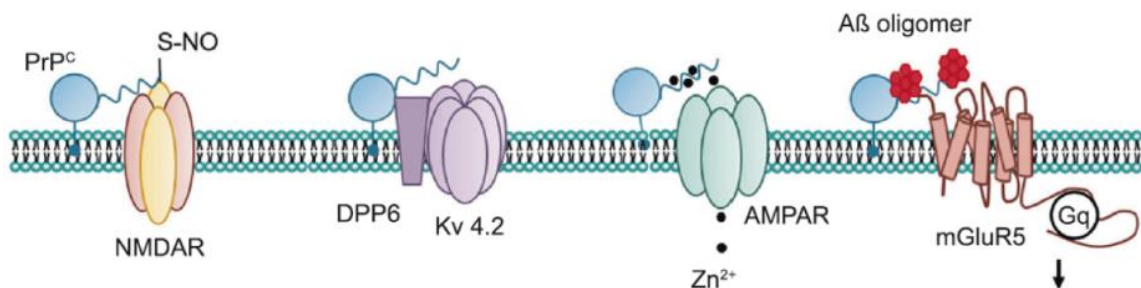


Figura 7: Complexos proteics amb els que la PrP^C interacciona a la sinapsi. D'esquerra a dreta trobem: el receptor d'NMDA, la proteïna DPP6 reguladora del canal Kv 4.2, el receptor d'AMPA, i l'oligòmer d'Aβ i el receptor metabotrópic mGluR5. Figura obtinguda de Wulf *et al*, 2017.

2.3 PrP^C: Paper en l'epilèpsia i l'hipocamp

Com acabem de comentar, PrP^C participa en la regulació de la sinapsi glutamatèrgica. Una de les patologies associades directament a la disfunció del sistema glutamatèrgic és l'epilèpsia. La unió d'aquests dos conceptes va conduir a l'estudi del paper de la PrP^C en aquesta patologia. Actualment, tot i que amb bastanta controvèrsia, es postula que PrP^C desenvolupa un paper neuroprotector enfront a l'excitotoxicitat epilèptica.

L'hipocamp és una estructura del lòbul temporal on la neurotransmissió glutamatèrgica desenvolupa un paper principal. La seva connectivitat es basa en el circuit trisinàptic, principalment glutamatèrgic. Aquest circuit s'ha convertit en un model d'estudi de la neurotransmissió glutamatèrgica per la seva accessibilitat *in vitro*, amb cultius organotípics, i *in vivo*. A més, sol ser un dels principals focus epilèptics. Atès a això, s'ha estudiat el paper de PrP^C en aquesta estructura en diferents aspectes: 1) l'epilèpsia; 2) la neurotransmissió i connectivitat; i 3) les funcions cognitives com l'aprenentatge i la memòria.

En una part d'aquesta tesi, veurem en el rol de PrP^C en la neuroprotecció epilèptica, la neurotransmissió hipocàmica, la conducta i l'aprenentatge. Per una banda, parlarem de la patologia de l'epilèpsia i dels models animals utilitzats per estudiar-la. Per l'altra, descriurem l'estructura i la connectivitat de l'hipocamp per continuar amb les seves funcions i la LTP. Per acabar, resumirem l'estat del coneixement de la implicació de PrP^C en aquests temes.

2.3.1 Epilèpsia: el glutamat i el GABA

L'epilèpsia pot tenir diferents causes, ja sigui genètiques, adquirides o ambientals amb afectació durant el desenvolupament. En tots els casos, una població de neurones perd la seva activitat normal i comença a activar-se sincrònicament i excessivament. Independentment del seu origen, l'epilèpsia prové principalment de l'alliberament excessiu de glutamat al terminal sinàptic. Tot i que també hi participa la desinhibició gabaèrgica (Chapman, 2000). S'ha descrit que els models murins deficientes pels receptors de glutamat o els seus transportadors cursen amb epilèpsia. El tractament amb antagonistes dels receptors AMPA, NMDA i mGluR tipus I són anticonvulsius. Actuen inhibint el sistema glutamatèrgic i desinhibint el gabaèrgic (Meldrum, 2000; Platt, 2007).

L'epilèpsia del lòbul temporal (TLE) és la causa majoritària d'epilèpsia focal adquirida en humans. Els pacients amb TLE presenten esclerosi a l'hipocamp amb mort neuronal selectiva a la regió CA1, CA3 i a l'*hilus* i ramificació aberrant de les fibres molsoses de l'hipocamp al gir dentat. Les fases principals de la TLE són: 1) el focus s'origina principalment a l'hipocamp i es pot propagar a l'amígdala i l'escorça entorrinal (Lothman *et al.*, 1991); 2) es produeix una lesió desencadenant inicial prèvia a la TLE, l'*status epilepticus* (SE) ; 3) hi ha un període de latència sense convulsions; i 4) es generen convulsions cròniques que ocasionen mort neuronal a l'hipocamp sobretot a les regions CA1-3 (Curia *et al.*, 2008).

2.3.2 Models animals per l'estudi de l'epilèpsia

S'han desenvolupat diferents models animals per estudiar la TLE. Aquests models es basen en l'administració de quimioconvulsius o l'estimulació elèctrica (*kindling*). Tots generen tres fases amb diferents característiques: 1) període d'unes hores amb SE; 2) fase de latència convulsiva amb lesions per l'SE; i 3) establiment d'epilèpsia crònica amb convulsions espontànies i recurrents (Vincent and Mulle, 2009). Els models quimioconvulsius més utilitzats han estat la pilocarpina, el pentilenetetrazol (PTZ), la bicuculina, l'NMDA i l'àcid kaínic (KA). La pilocarpina és un agonista colinèrgic muscarínic que indueix epilèpsia activant el receptors M1 colinèrgics de l'hipocamp i necessita els receptors glutamatèrgics d'NMDA per al manteniment de la crisi (Curia *et al.*, 2008). El PTZ i la bicuculina són un antagonistes del GABA que provoquen també convulsions generalitzades degut a la desinhibició gabaèrgica (Dhir, 2012). L'NMDA i el KA actuen directament en la sobreestimulació postsinàptica glutamatèrgica (Ishimoto *et al.*, 2000).

L'administració de KA és un mode àmpliament utilitzat tant en rata com en ratolí i és el que hem emprat en aquesta tesi. Fou proposat per primer cop a final dels anys setanta (Ben-Ari and Lagowska, 1978). Aquests model s'aproxima a la patologia dels pacients ja que es caracteritza per un període de latència precedit per l'SE fins l'aparició de les crisis epilèptiques recurrents. Les crisis epilèptiques que genera s'originen a la CA3 hipocàmpica i s'escampen a altres regions com la CA1, l'escorça i l'amígdala (Coppola and Moshe, 2012). Ens permet estudiar tant l'epileptogènesis en la fase aguda inicial del SE com en la crònica.

S'han desenvolupat models on el KA s'injecta directament al SNC (hipocamp o amígdala) o a nivell sistèmic. Es sol injectar intraperitonealment (i.p) amb varies administracions cada 30-60 minuts a dosis baixes (8-12mg/Kg) (Auladell *et al.*, 2017). Després de l'administració els ratolins presenten uns 30-60 minuts d'hipoactivitat seguits de les primeres convulsions. L'SE pot durar fins a 6-8 hores. En aquests període s'avalua la resposta epilèptica de l'animal comptabilitzant els episodis convulsius i classificant la severitat de la seva resposta epilèptica en una escala d'afectació (Peng *et al.*, 1997; Levesque and Avoli, 2013). També es comptabilitzen el nombre de crisis epilèptiques amb pèrdua d'equilibri (*seizures*) i els episodis de crisis agudes que afecten al tren inferior de l'animal i el fan saltar (*blinking* o *pop-corn behaviour*) (Rangel *et al.*, 2007).

2.3.3 L'hipocamp com a model d'estudi

Els primers neuroanatomistes ja van estudiar l'estructura d'aquesta regió del lòbul temporal del cervell (Ramon y Cajal, 1911). Des de llavors la seva connectivitat i fisiologia ha estat molt estudiada i s'ha convertit en un model d'estudi de neurotransmissió i plasticitat sinàptica. L'hipocamp està implicat en múltiples funcions cognitives superiors com la memòria i l'aprenentatge. A més, la seva degeneració és un tret fisiopatològic característic de patologies com l'epilèpsia, l'esquizofrènia i la malaltia d'Alzheimer (Anand and Dhikav, 2012).

Anatomia i connectivitat de l'hipocamp

L'hipocamp el formen dues estructures laminades plegades una sobre l'altra: el gir dentat (DG) i l'hipocamp propi (Figura 8). Aquestes dues regions més l'escorça entorrinal i el *subiculum* constitueixen la formació hipocàmpica (Amaral *et al.*, 2007). En aquesta tesi ens referirem a l'hipocamp com l'estructura global formada pel DG i l'hipocamp propi. L'hipocamp propi té forma de C i inclou tres regions del *Cornu Ammonis* (CA1, CA2 i CA3). És una estructura laminada amb una capa neuronal principal de neurones piramidals

glutamatèrgiques. Es considera que l'àrea CA2 no es troba en ratolins, així que no es comentarà. Presenta també varies capes d'interneurones gabaèrgiques (Amaral *et al.*, 2007; van Strien *et al.*, 2009). Les capes que formen l'hipocamp propi des de l'interior a la superfície són (Figura 8):

- l'*alveus*, feixos d'axons de les neurones piramidals cap a la fimbria o fòrnix;
- l'*stratum oriens* (so), dendrites basals neurones piramidals i interneurones;
- la capa piramidal o l'*stratum pyramidale* (sp), soma de les neurones piramidals i neurones de cistella que innerven el soma de les neurones piramidals;
- l'*stratum lucidum* (sl), només es troba a la regió CA3 i inclou els axons de la capa granular del DG que connecten amb les neurones piramidals;
- l'*stratum radiatum* (sr), dendrites apicals de les neurones piramidals;
- l'*stratum lacunosum moleculare* (slm), ramificacions distals de les dendrites apicals de les neurones piramidals on connecta la via entorrino-hipocàmpica de l'escorça entorrinal;
- la fissura hipocàmpica, regió que separa l'hipocamp propi i el DG.

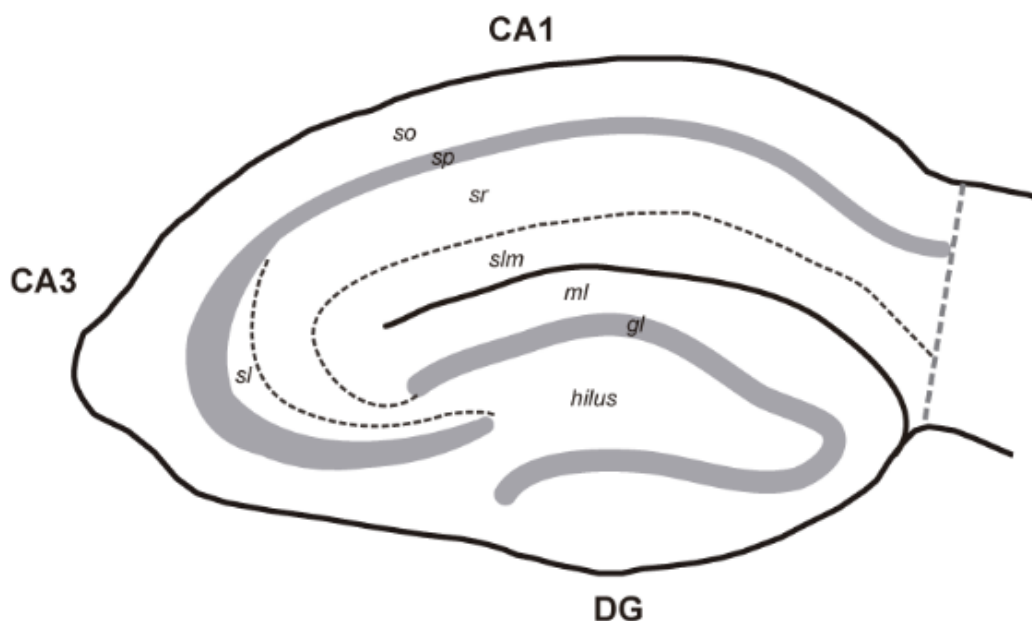


Figura 8: Esquema de l'hipocamp dorsal de ratolí. CA1-3: Cornu Ammonis 1-3, DG: gir dentat, so: *stratum oriens*, sp: *stratum pyramidale*, sr: *stratum radiatum*, slm: *stratum lacunosum moleculare*, sl: *stratum lacunosum*, ml: capa molecular i gl: capa granular.

El DG és una estructura en forma de V que presenta una capa principal de neurones piramidals, les anomenades cèl·lules granulars (Figura 8). Està laminat amb tres capes (Amaral *et al.*, 2007; van Strien *et al.*, 2009):

- la capa molecular (ml) o *stratum moleculare*, dendrites de les cèl·lules granulars i interneurons. Rep connexions de l'escorça entorrinal, del septum i de les cèl·lules molsoses de l'*hilus* (h);
- la capa granular (gl) o *stratum granulosum*, soma de les cèl·lules granulars i interneurons. Aquestes neurones emeten axons que travessen l'*hilus* formant les fibres molsoses. La regió més propera a l'*hilus* s'anomena zona subgranular (SGZ) i és un dels dos nínxols neurogènics del cervell adult juntament amb la zona subventricular cortical (SVZ);
- l'*hilus*, cèl·lules molsoses i els axons de les fibres molsoses cap a les dendrites apicals de les neurones piramidals de CA3.

Les estructures que formen la formació hipocàmica estan connectades per tres connexions unidireccionals glutamatèrgiques (Deng *et al.*, 2010). És el que es coneix com el circuit trisinàptic (Figura 9):

1) la via perforant o connexió entorrino-hipocàmica: l'escorça entorrinal, sobretot les capes més superficials, projecten axons d'entrada a l'hipocamp. Per una banda, innerven les cèl·lules granulars del DG a la capa molecular i per l'altra les dendrites apicals de l'hipocamp propi a l'*stratum lacunosum moleculare* de CA1 i CA3.

2) les fibres molsoses: les cèl·lules granulars del DG projecten a les dendrites apicals de les neurones piramidals de CA3 a l'*stratum lucidum*. També poden projectar col·laterals amb interneurons inhibidòries del propi DG i les cèl·lules molsoses.

3) les fibres col·laterals de Schaffer: les neurones piramidals de CA3 projecten a l'*stratum radiatum* i l'*stratum oriens* de la regió CA1 de l'hipocamp ipsilateral.

Per tancar el cercle de les connexions de la via trisinàptica falta afegir les projeccions de CA1 al *subiculum* i a l'escorça entorrinal. Aquest model es considera una reducció de la connectivitat real de l'hipocamp ja que no té en compte altres connexions com per exemple les que innerven la CA2 o les connexions de les interneurons inhibidòries. No obstant, s'ha utilitzat àmpliament com a model d'estudi de la LTP i la plasticitat sinàptica (van Strien *et al.*, 2009).

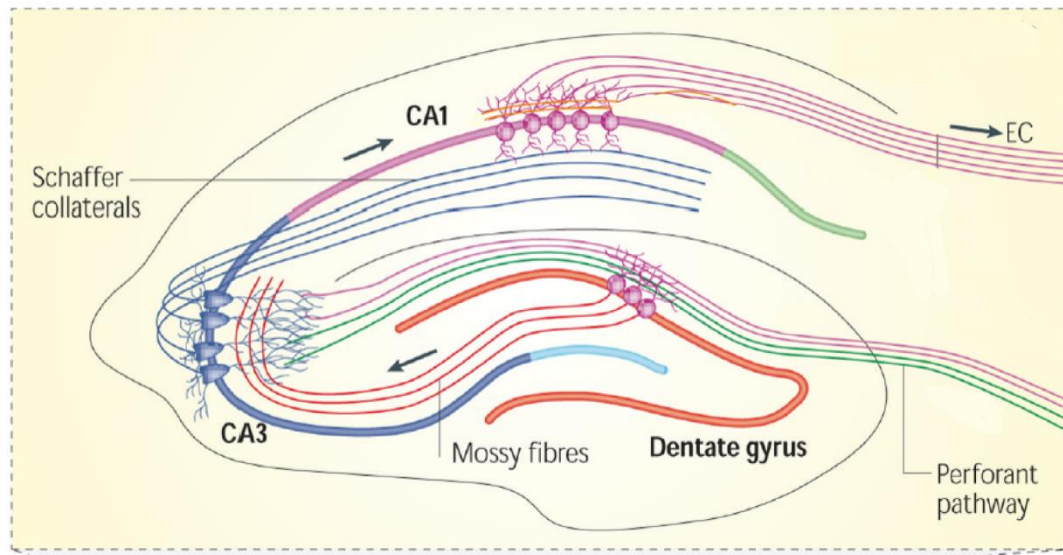


Figura 9: Circuit trisinàptic de l'hipocamp. S'observa la via perforant provinent de l'escorça entorrinal (EC), les fibres molsoses (*mossy fibers*) i les fibres col·laterals de Schaffer. Imatge adaptada de Deng *et al*, 2010.

Funcions de l'hipocamp

L'hipocamp realitza un paper cabdal en l'aprenentatge i la memòria. Es considera un node central en la xarxa de connexions que permeten la formació, consolidació i evocació de la memòria. Aquesta xarxa inclou regions corticals associatives, nuclis subcorticals, el lòbul temporal medial i les àrees parahipocàmiques. Està implicat en la memòria semàntica i episòdica, així com de la consolidació de la memòria lligada al son. També participa en regulació de les emocions, l'estrès i l'ansietat. S'ha descrit també el seu paper en la memòria i orientació espacial (Bartsch and Wulff, 2015).

Aquesta regió posseeix una gran plasticitat per poder codificar la informació. Presenta una alta modulació de l'arbre dendrític i de les espines dendrítiques, així com una elevada generació de noves sinapsis i neurones. Alguns autors postulen que aquesta elevada capacitat plàstica que presenta l'hipocamp li confereix alhora una major vulnerabilitat a agents patològics com l'epilèpsia, la isquèmia, la inflamació i la neurodegeneració. Els mecanismes sinàptics intrínsecs que regulen la plasticitat, com la seva excitabilitat, en situacions d'estrès poden predisposar al dany cel·lular com ocorre amb la ramificació aberrant de les fibres molsoses de l'hipocamp a l'epilèpsia (Bartsch and Wulff, 2015).

L'hipocamp a l'epilèpsia

L'esclerosi hipocàmica és l'alteració més típica en l'epilèpsia. Es caracteritza per astrogliosi i mort neuronal extensa degut a l'excitotoxicitat, sobretot de les neurones piramidals. En els models experimentals de TLE, l'origen de les crisis està a la regió CA3 hipocàmica. Aquesta regió és susceptible als models de KA degut a l'elevada expressió de receptors d'aquest tipus. Per això en models de TLE a la capa piramidal de CA1, la seva projecció principal, i a la pròpia CA3, s'observa una elevada mort neuronal per excitotoxicitat. En els models animals de TLE així com en els pacients, després de l'*status epilepticus* s'observa una ramificació aberrant de les fibres molsoses a l'hipocamp acompanyada d'un increment de receptors KA a la regió. Es creu que aquest dos fenòmens participen en la patogènesi i cronificació de la TLE (Artinian *et al.*, 2011; Lerma and Marques, 2013).

És important remarcar també el paper de la sinapsi gabaèrgica en l'afectació hipocàmica de la TLE. En els models d'inducció per KA no només hi ha sobreexcitació postsinàptica glutamatèrgica, sinó desinhibició gabaèrgica. Els receptors de KA presinàptics de les interneurons gabaèrgiques de CA1 inhibeixen l'alliberament de GABA com ocorre també amb els models amb PTZ (Rodriguez-Moreno *et al.*, 1997). Per una altra banda, l'epilèpsia provoca també un augment de la neurogènesi a la SGZ de l'hipocamp que es manté durant setmanes després de l'*status epilepticus*. Aquestes noves neurones se situen ectòpicament generant connexions aberrants. Aquestes anomalies alteren la connectivitat hipocàmica propiciant l'epileptogènesi crònica (Jessberger and Parent, 2015).

2.3.4 Funció neuroprotectora de PrP^C a l'epilèpsia

El nostre grup va observar que PrP^C interactua amb els receptors de KA, concretament amb les subunitats GluK2/GluK3, i que mitjançant la interacció amb la PSD-95 s'activa la via de JNK3 que provoca la excitotoxicitat en els models d'inducció epilèptica per KA (Carulla *et al.*, 2011). També vam descriure que les subunitats GluK2 i GluK3 estan sobreexpressades a l'hipocamp del model ZHI-*Prnp*^{0/0} i en cèl·lules N2a on transitòriament s'havia reduït l'expressió de PrP^C amb siRNA (Rangel *et al.*, 2007). En un tercer treball, vam descriure que també estaven aquestes i altres subunitats glutamatèrgiques i la GABA_A-γ2 sobreexpressades en el model de sobreexpressió de PrP^C, el Tga20 (Rangel *et al.*, 2009). Tots aquests resultats apunten a l'excessiva expressió de receptors glutamatèrgics com la causa de l'excitabilitat de la sinapsi *Prnp*^{0/0}.

El rol de PrP^C en la sinapsi glutamatèrgica s'ha estudiat sobretot en la neuroprotecció enfront a la excitotoxicitat epilèptica. Es va descriure que l'animal *Prnp*^{0/0} presenta una ramificació aberrant de les fibres molsoses semblant al que presenten els pacients epilèptics (Colling *et al.*, 1997). És un dels camps on s'han publicat resultats més contradictoris i el paper real de PrP^C encara no es coneix. Per una banda, alguns grups, inclòs el nostre, hem observat que els animals *Prnp*^{0/0} són més susceptibles a la inducció epilèptica per PTZ (Walz *et al.*, 1999) i per KA (Rangel *et al.*, 2007; Carulla *et al.*, 2011). Per l'altra, altres grups han descrit que l'absència de PrP^C augmenta el llindar epilèptic (Ratte *et al.*, 2011) i que l'expressió de PrP^C no afecta a la susceptibilitat a KA (Striebel *et al.*, 2013b). Aquesta diferència de resultats probablement prové de l'ús de diferents models de ratolí *Prnp*^{0/0}, aproximacions experimentals i protocols. S'ha descrit major susceptibilitat *in vivo* en el model ZHI amb KA (Rangel *et al.*, 2007) i amb PTZ (Walz *et al.*, 1999). En canvi, s'han obtingut resultats contraris induint amb KA emprant cultius organotípics amb el model mixt FVB/N (Ratte *et al.*, 2011) i *in vivo* amb el model mixt C57BL/10SnJ i amb el model pur Edg (Striebel *et al.*, 2013b).

El treball d'Striebel i col·laboradors apunta que podria ser la influència dels *Flanking genes* qui regula la neuroprotecció a KA i per això s'observen diferències entre les diferents soques de ratolins (Striebel *et al.*, 2013b). El mateix any es publicava que era l'efecte d'aquests *Flanking genes* qui regulava la fagocitosi i no l'absència de PrP^C (Nuvolone *et al.*, 2013). En conclusió, és necessària investigació utilitzant nous models purs de ratolí per poder desxifrar el rol real de PrP^C en la neuroprotecció i en la sinapsi glutamatèrgica en general ja que la majoria de treballs s'han realitzat en models amb fons mixtes que expressen *Flanking genes* provinents del model 129/Ola.

2.3.5 La potenciació a llarg termini

La potenciació a llarg termini és un tipus de plasticitat sinàptica que provoca la intensificació d'una connexió degut a la seva activitat repetida. Fou descrita per primer cop estimulant el DG del conill (Bliss and Gardner-Medwin, 1973). Es considera el mecanisme cel·lular principal de l'aprenentatge i la memòria. L'LTP s'ha descrit en múltiples connexions del SNC, no obstant, l'estudi d'aquest fenomen s'ha realitzat sobretot en la connexió col·lateral de Schaffer de l'hipocamp (Martin *et al.*, 2000). Aquest model ens servirà per explicar com funciona l'LTP i introduir part de l'experimental que s'ha realitzat en aquesta tesi.

Quan s'estimula a la regió CA3, es registra un potencial excitador postsinàptic de camp (fEPSP) a l'stratum radiatum de la regió CA1 ipsilateral seguint la fibra col·lateral de Schaffer. Si s'hi aplica una estimulació tetànica, l'fEPSP que es registra després presenta

una amplitud major que abans de l'estimulació degut a la potenciació. L'estimulació tetànica o d'alta freqüència (HFS) consisteix en la repetició de varis trens (10-200ms) d'estimulacions d'alta freqüència (100-200Hz) a una intensitat que superi el llindar d'activació sinàptica. Perquè es generi la LTP la freqüència de l'HFS ha de ser prou alta perquè es sumin temporalment els fEPSPs consecutius generant una despolarització suficient que activi certes vies de senyalització al terminal postsinàptic que acabin activant mecanismes de plasticitat sinàptica. Aquesta potenciació del senyal es manté al llarg dels dies i fins i tot setmanes. Es creu que l'adquisició de memòria ocorre mitjançant aquest fenomen, l'ús repetit d'una sinapsi incrementa la seva connectivitat potenciant-la i conservant-la durant el temps (Martin *et al.*, 2000; Delgado-Garcia and Gruart, 2017).

Tot i que hi ha algunes excepcions, el mecanisme necessari i suficient per a la generació d'LTP és l'activació dels receptors NMDA. Aquesta activació potencia vies de senyalització subjacents que modifiquen el terminal postsinàptic activant mecanismes de plasticitat sinàptica que potenciarien la sinapsi (Herring and Nicoll, 2016) (Figura 10). S'ha descrit que l'administració d'antagonistes de l'NMDA bloquegen la generació de LTP (Delgado-Garcia and Gruart, 2017). L'entrada massiva de Ca^{2+} pels canals NMDA activa la CaMKII i la recluta a l'espina dendrítica (Lisman *et al.*, 2012). Aquesta fosforila la subunitat GluA1 dels receptors AMPA (Barria *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003). La fosforilació de la GluA1 n'augmenta el seu reclutament al terminal sinàptic i n'incrementa la conductivitat del canal (Kristensen *et al.*, 2011). CaMKII també fosforila algunes proteïnes transmembrana reguladores d'AMPA (TARPs) com l'Stargazina. La fosforilació de TARPs augmenta el trànsit dels receptors d'AMPA a la densitat postsinàptica (PSD) (Sumioka *et al.*, 2010). No obstant, resultats dels darrers anys han posat en dubte que sigui indispensable el tàndem AMPA/TARP per la generació de l'LTP. S'ha observat que eliminant o substituint la subunitat GluA1 per subunitats de receptors de KA es continua generant LTP. Això fa pensar que hi ha altres mecanismes, i no només l'AMPA/TARP, que generen LTP (Granger *et al.*, 2013). Actualment es postula que AMPA/TARP regula el llindar i la magnitud de la LTP, però no és essencial per la seva generació (Herring and Nicoll, 2016).

Participen més vies de senyalització i mecanismes cel·lulars per la generació de l'LTP a part de la via de CaMKII i el reclutament de nous receptors AMPA (Figura 10). S'ha descrit que hi ha una remodelació física de les espines sinàptiques. Per una banda, el seu volum augmenta després de l'estimulació dels receptors NMDA degut a la polimerització del citoesquelet d'actina (Matsuzaki *et al.*, 2004). S'ha descrit que aquesta polimerització és promoguda per l'activació de les Rho-GTPases (Herring and Nicoll, 2016). Això augmenta la superfície de contacte de la sinapsi i permet encabir més receptors AMPA. També s'indueix la fosforilació i remodelació de les proteïnes de la PSD per part de la CaMKII que

permet acomodar els nous receptors AMPA al terminal (Opazo *et al.*, 2012). S'ha descrit que el 70-80% dels receptors d'AMPA reclutats provenen de la difusió i concentració a l'espai sinàptic de receptors preexistents perisinàptics i el 10-30% prové de nous receptors excitats. Aquesta exocitosi és depenent de l'activació de la via Ras-ERK (Patterson *et al.*, 2010).

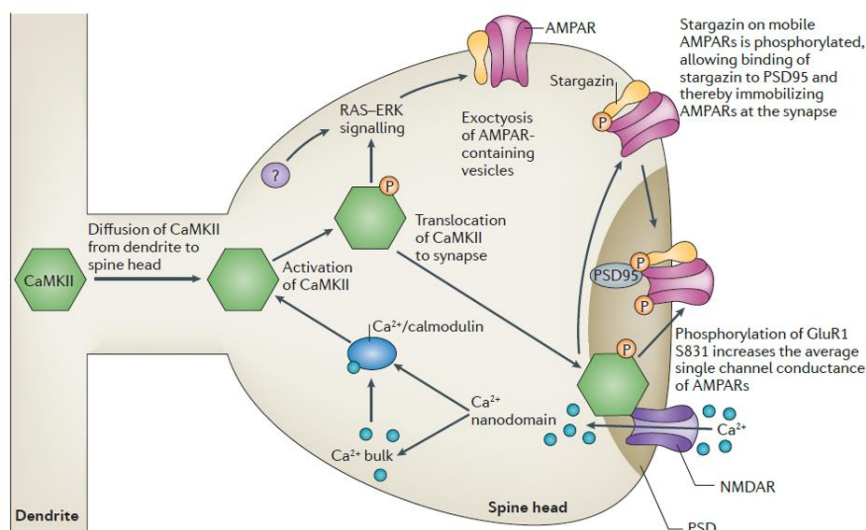


Figura 10: Activació de la via CaMKII per la inducció de la potenciació a llarg termini. L'entrada massiva de Ca^{2+} a través dels receptors d'NMDA activa la calmodulina. Aquesta activa la CaMKII que ha difós a l'espina dendrítica i es transloca a la densitat postsinàptica (PSD) on incrementa l'activitat dels canals d'AMPA per dues vies. Per una banda, fosforilada la subunitat GluR1 augmentant-li la conductivitat. Per l'altra, fosforila l'Stargazina que juntament amb la PSD-95 recluten nous receptors AMPA a la part activa del terminal. La CaMKII activaria a través de la via RAS-ERK l'exocitosis de nous receptors AMPA. Imatge obtinguda de Lisman *et al.*, 2012.

2.3.6 Participació de la PrP^C en l'LTP: Antecedents

Els primers estudis amb els models de ratolí deficientes per a PrP^C no van descriure cap deficiència cognitiva, del desenvolupament ni anatòmica (Büeler *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1994). Més endavant es van realitzar estudis més profunds sobre el paper de PrP^C en la neurotransmissió. Es va descriure que els ratolins *Prnp*^{0/0} presentaven una LTP reduïda a la connexió de les fibres col·laterals de Schaffer i una reducció de la inhibició gabaèrgica tant en el model ZHI (Collinge *et al.*, 1994) com en el model Edg (Manson *et al.*, 1995). Aquests resultats han estat reproduïts per altres grups (Criado *et al.*, 2005), no obstant s'ha publicat també que la seva absència no modifica la LTP (Lledo *et al.*, 1996; Lauren *et al.*, 2009; Freir *et al.*, 2011) o que la incrementa (Rangel *et al.*, 2009).

2.3.7 Efecte de l'absència de PrP^C en aprenentatge i conducta

Com hem comentat en l'apartat anterior, tot i la controvèrsia, podem dir que PrP^C participa en la neurotransmissió glutamatèrgica i la generació de la LTP. Aquest fenomen és considerat la base de l'aprenentatge i la memòria. A més, el deteriorament cognitiu és un dels primers símptomes en les Prionopaties (Caine *et al.*, 2015). Conseqüentment a això, s'han estudiat aquestes capacitats cognitives en els models *Prnp*^{0/0}.

Per una banda, resultats amb diferents soques d'animals *Prnp*^{0/0} han descrit dèficits en aprenentatge i memòria. S'han observat deficiències en l'adquisició de memòria espacial amb els models Edg i C57Bl10/SnJ (Criado *et al.*, 2005). S'ha observat que els animals ZHI-*Prnp*^{0/0} realitzen pitjor el test de fabricació del niu (*Nest Building Test*), el test de reconeixement d'objectes en edats avançades i en l'adquisició de memòria associativa amb el test de condicionament per por (*Fear Conditioning Test*) (Schmitz *et al.*, 2014a). També s'han descrit dèficits de memòria a curt i a llarg termini en rata on s'alterava la funció de PrP^C bloquejant-la directament amb anticossos (Coitinho *et al.*, 2007). Altres autors han relacionat l'absència de PrP^C amb un conducta depressiva i dèficits motors. S'ha descrit que el ratolí ZHI mostra una tendència depressiva segons el test de la cua en suspensió (*Tail Suspension Test*) i el test de natació forçada (*Forced Swimming Test*) (Gadotti *et al.*, 2012). Utilitzant també el ZHI, altres autors observen una reducció de l'activitat relacionada amb l'edat segons el test del camp obert (*Open Field*) (Rial *et al.*, 2009).

No obstant, en el primer treball amb el model ZHI no es van descriure dèficits de memòria amb el test del laberint aquàtic de Morris (Büeler *et al.*, 1992) i altres grups han obtingut resultats similars desvinculant PrP^C de l'aprenentatge. Amb el model Edg tampoc es van descriure dèficits, tot i que no es mostra cap test (Manson *et al.*, 1994). Un estudi posterior observa el mateix resultat amb el model ZHI, no observen cap deficiència de memòria ni en animals vells de dos anys (Lipp *et al.*, 1998). Altres treballs descriuen que la PrP^C regula els dèficits de memòria espacial ocasionades per l'Aβ en el model murí d'AD (APP/PS1) però quan comparen els animals APP/PS1^{0/0}-*Prnp*^{0/0} i APP/PS1^{0/0}-*Prnp*^{+/+} no observen diferències (Gimbel *et al.*, 2010; Salazar *et al.*, 2017).

El paper real de PrP^C en les capacitats cognitives i l'aprenentatge encara és controvertit. Tot i que la majoria d'estudis descriuen dèficits en els models *Prnp*^{0/0}, els resultats no es reproduïen sempre i a cada treball trobem interpretacions diferents (Schmitz *et al.*, 2014b). A més, bona part d'aquests resultats estan obtinguts amb el model ZHI arrossegant l'efecte dels *Flanking genes* que, com hem explicat ja, han emmascarat altres fenotips lligats a l'absència de PrP^C (Nuvolone *et al.*, 2013).

2.4 PrP^C: Altres funcions fisiològiques

Des del seu descobriment i, sobretot, des de la generació dels primers models deficients per a la PrP^C, se l'ha relacionat amb múltiples funcions al SNC, al SNP i inclús en altres funcions sistèmiques com el metabolisme de la glucosa o en el càncer (Hirsch *et al.*, 2017). Per acabar aquest apartat, es comentaran dues d'aquestes funcions: el paper en la mielinització del SNP i en la neurogènesi i diferenciació neuronal.

2.4.1 Rol de PrP^C en el manteniment de la mielinització del SNP

S'ha comprovat amb diferents ratolins *Prnp*^{0/0} el paper de PrP^C en el manteniment de la mielinització del SNP. Els animals genoanul·lats desenvolupen una neuropatia perifèrica crònica desmielinitzant a edats avançades (≈60 setmanes). PrP^C neuronal seria necessària per la mielinització de les cèl·lules de Schwann al axons del SNP. Aquest resultat s'ha comprovat amb els models ZHI, Edg i Cre-loxP (Bremer *et al.*, 2010) i recentment, amb el nou model co-isogènic ZH3 (Nuvolone *et al.*, 2016). En un últim treball descriuen que la unió del domini N-terminal de la PrP^C s'uneix al receptor Adgrg6 de les cèl·lules de Schwann per mantenir l'homeòstasi mielínica (Kuffer *et al.*, 2016).

2.4.2 PrP^C en el desenvolupament, la proliferació i la diferenciació del SNC

La PrP^C s'expressa durant l'estadi embrionari a partir d'E7,5 en ratolí (Manson *et al.*, 1992; Tremblay *et al.*, 2007). Tot i això, la seva deleció no s'ha relacionat amb cap deficiència notòria durant el desenvolupament. Es considera que la seva funció es compensada per altres proteïnes durant aquesta etapa. Es va plantejar que podrien ser Doppel i Shadoo, codificades per gens paràlegs de *Prnp* (*Prnd* i *Sprn*). Estudis seguint aquesta teoria no han aconseguit aportar cap resultat evident (Miranda *et al.*, 2011), només s'ha descrit que la deleció doble de *Prnp* i *Sprn* generaria letalitat embrionària, i que, per tant, la funció de com a mínim una de les dues proteïnes és essencial pel correcte desenvolupament del fetus (Young *et al.*, 2009).

Alguns treballs ha relacionat la PrP^C amb la neurogènesi i la diferenciació neuronal. El treball d'Steele i col·laboradors descriu que l'animal *Prnp*^{0/0} presenta menys proliferació a la SVZ i al DG. PrP^C s'expressaria en els precursors neurals i, de forma dosi-dependent, regularia positivament la diferenciació neuronal (Steele *et al.*, 2006). S'ha observat també

un dèficit en la proliferació l'animal *Prnp*^{0/0} cap al bulb olfactori (Parrie *et al.*, 2018) i en neuroesferes de la SVZ (Prodromidou *et al.*, 2014). El nostre grup va descriure el paper de PrP^C en la diferenciació i proliferació dels precursors d'oligodendròcits (Bribián *et al.*, 2012). Aquests treballs s'han realitzat amb diferents models de ratolí mixtes amb els *Flanking genes*, no obstant, semblarien apuntar a què la PrP^C participaria en el desenvolupament neural (Wulf *et al.*, 2017).

L'expressió de PrP^C també s'ha relacionat amb la neuritogènesi i la guia axonal. S'ha descrit que la PrP^C regula la neuritogènesi modulant la via RhoA/ROCK/Cofilina a través de l'activitat de la integrina $\beta 1$ (Loubet *et al.*, 2011). Utilitzant cultius primaris hipocàmpics, s'ha observat que la interacció de PrP^C amb la molècula d'adhesió de cèl·lules neurals (NCAM) activa la neuritogènesi (Santucciione *et al.*, 2005). Finalment, s'ha descrit el paper de la interacció homofílica PrP^C-PrP^C com a molècula atraient durant la guia axonal *in vitro* (Amin *et al.*, 2016).

3. Paper de PrP^C en altres malalties neurodegeneratives

El 2009 es va produir un descobriment que va reenfocar l'estudi de la proteïna priònica cel·lular. Es va descriure PrP^C com un receptor dels agregats oligomèrics de la proteïna β -amiloide (A β) i en el context de la malaltia d'Alzheimer (Lauren *et al.*, 2009). A partir d'aquests descobriments es va obrir una nova línia d'investigació per intentar entendre el paper de PrP^C en l'agregació i la fosforilació aberrant de Tau en la malaltia d'Alzheimer i en altres malalties neurodegeneratives com a possible diana terapèutica.

Aquest capítol s'emmarca en les funcions de PrP^C més enllà de les Prionopaties. Un capítol d'aquesta tesi se centra en el paper de PrP^C en la regulació de la fosforilació i l'*splicing* de Tau en una variant de la GSS comòrbida amb Taupatia. Per contextualitzar aquesta part del projecte, s'introduirà: 1) la malaltia d'Alzheimer, els seus agregats d'A β i de Tau; 2) les Taupaties; i 3) la comorbiditat de les Prionopaties amb la Taupatia. També es parlarà de PrP^C com a receptor amiloide més enllà de l'AD. Finalment, s'explicarà què es coneix del paper de PrP^C en aquestes malalties i introduïrem el model cel·lular que hem utilitzat en aquesta tesi, el cultiu de cèl·lules mare pluripotents induïdes (*iPSC*).

3.1 PrP^C en la malaltia d'Alzheimer (AD)

En aquest apartat es parlarà breument de la fisiopatologia, l'epidemiologia i del que es coneix de l'etiologia de l'AD. Després s'incidirà en la proteïna Tau i la seva regulació per explicar les Taupaties i el paper de PrP^C. Explicarem com a base per descriure el paper de PrP^C en aquesta malaltia neurodegenerativa i ho enllaçarem en les

3.1.1 La malaltia d'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer és una malaltia neurodegenerativa progressiva letal majoritàriament esporàdica. Es caracteritza per un deteriorament cognitiu progressiu que afecta a diferents regions del cervell involucrades en la personalitat, la memòria i la realització de tasques quotidianes. Tots i els avenços en la recerca, encara no hi ha cap tractament que la reverteixi totalment i, excepte en els casos genètics, tampoc se n'ha descobert la causa.

Prevalença i incidència de l'AD

L'AD és la causa principal de demència al món (≈70% del total). És més freqüent en països desenvolupats on té una incidència d'uns 5-8 casos cada 1000 persones per any. La seva prevalença està al voltant de 25-30 milions de persones i es creu que es duplicarà en vint anys degut a l'envelliment de la població. Afecta sobretot a persones de més de 60-65 anys, tot i que en els casos d'origen familiar (fAD), al voltant del 5% del total, la simptomatologia comença abans (Calderon-Garciduenas and Duyckaerts, 2017).

S'han descrit factors de risc genètics a l'AD, com la presència de l'al·lel ε4 de l'apolipoproteïna E (ApoE). No obstant, no s'ha trobat cap factor ambiental, social o genètic que sigui suficient per predir l'aparició de l'AD. Només algunes mutacions en gens del processament de l'Aβ cursen irremeiablement amb fAD. Afecten als gens *PSEN1*, *PSEN2* i *APP* que participen en el processament i formació dels oligòmers d'Aβ (Gaiteri *et al.*, 2016).

Les plaques amiloides i els cabdells neurofibril·lars

La histopatologia de l'AD es basa en l'acumulació extracel·lular d'Aβ i l'agregació intracel·lular de la proteïna Tau. L'Aβ és el producte del fraccionament de la proteïna precursora amiloide (APP). Aquesta proteïna de membrana pot ser processada per la via amiloidogènica o la no amiloidogènica. A la via no amiloidogènica l'α-secretasa i després la γ-secretasa tallen l'APP de la membrana. Generen fragments que participarien de forma paracrina o autocrina en la fisiologia normal de la neurona modulant, entre d'altres, la proliferació cel·lular i la neuritogènesi. Per altra banda, trobem el processament per la via amiloidogènica. En aquest cas, l'APP es tallada per la β-secretasa (BACE1) i després per la γ-secretasa generant l'Aβ de 40 o 42 AA (Willnow *et al.*, 2008; Calderon-Garciduenas and Duyckaerts, 2017). L'Aβ té tendència a agregar-se en forma d'oligòmers primer i després en forma de protofibril·les i fibril·les que acabaran formant les plaques amiloides.

Aquestes plaques es formen al parènquima neuronal de l'escorça dels pacients d'AD provocant mort neuronal i gliosis reactiva (Haass et al., 2012).

L'altra característica histopatològica de l'AD són els cabdells neurofibril·lars (NFTs) formats principalment per la proteïna Tau. La funció fisiològica principal d'aquesta proteïna és l'estabilització dels microtúbuls de tubulina (MTs). La seva activitat està regulada pel seu estat de fosforilació segons l'equilibri entre fosfatases i cinases. A l'AD, aquest equilibri es veu alterat i la proteïna Tau s'hiperfosforila reduint la seva capacitat d'unir-se als microtúbuls. La hiperfosforilació augmenta la tendència de Tau a plegar-se anòmalament i acumular-se al citosol. S'acaba agregant sobretot al compartiment somatodendrític, formant primer els filaments helicoidals, rics en làmina β , i finalment els NFTs (Ballatore et al., 2007).

En el camp hi ha certa discussió sobre l'origen de la neurodegeneració en l'AD, si són els cúmuls d'A β o els cabdells neurofibril·lars. Segons la hipòtesi amiloide, l'agregació de l'A β inicia una reacció en cadena que acabaria provocant la neuropatologia de l'AD (Hardy and Higgins, 1992). No obstant, s'han publicat resultats que demostren que l'A β no seria suficient per provocar la neurodegeneració. S'ha descrit que l'A β no és tòxica en cultius primaris neuronals provinents d'animals deficientes per a Tau, per tant, Tau seria també necessària per la toxicitat (Rapoport et al., 2002). A més, les plaques amiloides i els NFTs afecten a regions diferents al llarg de la progressió de la malaltia demostrant que no són processos necessàriament concomitants (Braak and Braak, 1996). Actualment, tot i la controvèrsia, la teoria més acceptada és que l'A β precedeix els NFTs. Es postula que els oligòmers d'A β són els primers efectors de la toxicitat induint la pèrdua sinàptica, el primer tret fisiopatològic de l'AD. No obstant, la patologia associada a Tau concomitant és decisiva per l'avenç de la neurodegeneració i correlaciona directament amb la clínica de l'AD.

3.1.2 La proteïna Tau

Tau és una proteïna de 55 kDa expressada principalment en el SNC on és particularment abundant en els axons neuronals, però també s'expressa a la glia. La seva funció principal és l'estabilització dels microtúbuls i també s'ha observat que participa en la regulació de la plasticitat sinàptica, l'estabilitat de l'heterocromatina, el trànsit vesicular i la dinàmica del citoesquelet d'actina (Sotiropoulos et al., 2017). Les Taupaties és un conjunt de malalties neurodegeneratives que presenten l'agregació de Tau al SNC, entre les quals trobem l'AD (Lee et al., 2001).

Darrerament, s'ha publicat que la propagació dels cúmuls patogènics de Tau per un mecanisme similar a un prió podrien ser cabdals en el procés neurodegeneratiu. Aquesta teoria es va iniciar amb les primeres publicacions que demostraven que la Tau extracel·lular era capaç de propagar-se cèl·lula-cèl·lula *in vitro* (Frost *et al.*, 2009) i *in vivo* (Clavaguera *et al.*, 2009). També s'ha descrit que la Tau agregada tindria la capacitat de transmetre la seva capacitat d'agregació a la Tau endògena de forma prionica (Alonso *et al.*, 1996). A partir d'aquests nous resultats, una part de la recerca s'està centrant en esclarir els mecanismes pels quals s'externalitzen i difonen els agregats de Tau com a possibles dianes terapèutiques (Fuster-Matanzo *et al.*, 2018).

El gen Mapt i el seu splicing alternatiu

Tau està codificada pel gen *Mapt*. Aquest gen es troba al cromosoma 11 en ratolins i al 17 en humans. Presenta 16 exons i a partir d'11 d'aquests exons es codifiquen per *splicing* alternatiu les 6 isoformes que s'expressen en el SNC. Difereixen entre elles pel nombre de repeticions de la regió d'unió a tubulina. S'agrupen en les isoformes que en tenen 3 o 4 (3R o 4R) depenent de si s'elimina o no l'exó 10 durant l'*splicing*. Els exons 2 i 3 també sofreixen *splicing* generant tres isoformes diferents: si conserven només l'exó 2, els exons 2 i 3 o cap (1N, 2N i 0N). La combinació d'aquests dos trets formen les 6 isoformes que trobem al SNC: 3R/0N, 3R/1N, 3R/2N, 4R/0N, 4R/1N i 4R/2N (Lee *et al.*, 2001) (Figura 11).

En el cervell adult, la ràtio entre les isoformes 3R i les 4R és al voltant de la unitat. En canvi, durant el desenvolupament s'expressen més les isoformes 3R i en el SNC fetal només s'expressa la isoforma 3R/0N (Goedert *et al.*, 1989; Goedert and Jakes, 2005). L'alteració d'aquest equilibri s'ha relacionat amb alguns tipus de Taupatia com la demència frontotemporal associada al cromosoma 17 (FTD-17) i la malaltia de Pick (Hong *et al.*, 1998; Fuster-Matanzo *et al.*, 2018). S'han descrit més de 30 mutacions al gen *Mapt* que cursen amb FTD-17 i en algunes d'elles ocasionen un augment de les formes 4R ja que afecten a regions que regulen l'*splicing* o directament a l'exó 10 o l'intró 10-11 (Goedert and Jakes, 2005).

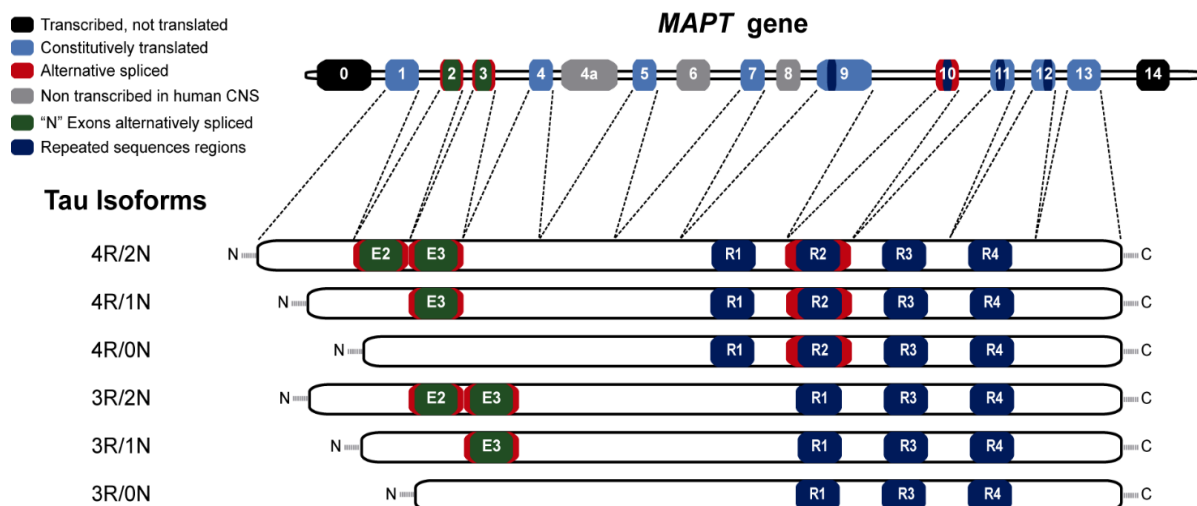


Figura 11: Esquema del gen Mapt i les isoformes que es generen per *splicing* al SNC. El gen presenta 16 exons. El 0 i el 14 es transcriuen però no es tradueixen (negre). L'1, el 4, el 5, el 7, el 9, l'11, el 12 i el 13 es tradueixen sempre (blau clar). El 4a i el 8 no es transcriuen en el SNC humà (gris). El roig es mostren els exons que sofreixen *splicing* alternatiu el 2, el 3 i el 10. Les diferents combinacions d'*splicing* d'aquests tres exons produeix les sis isoformes de la proteïna. Esquema propi seguint el model de Lee et al, 2001.

La fosforilació de Tau

L'equilibri entre fosforilació i desfosforilació de Tau és primordial per la correcta estabilització dels MTs i pel trànsit vesicular axonal mediat per dineïnes i kinesines (Figura 12). Tau és necessària pel manteniment de la integritat dels microtúbuls, però també suposa un obstacle pel trànsit vesicular per sobre dels MTs. La seva fosforilació la separa dels MTs permetent la mobilitat vesicular, però la seva absència també els desestabilitza. Per tant, un cicle ben regulat de fosforilació i desfosforilació de Tau és necessari pel manteniment dels MTs i el correcte trànsit axonal (Ballatore *et al.*, 2007). A més, s'ha descrit que la hiperfosforilació de Tau la mobilitza dels axons al compartiment somatodendrític i a les espines dendrítiques on causa disfunció sinàptica alterant el trànsit dels receptors glutamatèrgics (Hoover *et al.*, 2010). La hiperfosforilació afecta també la seva degradació via autofàgia o proteasoma i també n'augmenta la seva agregació per acabar formant el NFTs (Fuster-Matanzo *et al.*, 2018).

Tau presenta 85 residus fosforilables. Se n'han descrit 28 fosforilats només en cervells de pacients l'AD, 31 només en condicions fisiològiques i 16 en ambdós casos (Martin *et al.*, 2013). S'han descrit diverses cinases que fosforilen Tau, les més rellevants són la cinasa de la glicogen sintasa 3 (GSK3), la PKA, la cinasa dependent de ciclina 5 (Cdk5) i la cinasa

reguladora de l'afinitat per MTs. Pel que fa a les fosfatases, la fosfatasa de proteïnes 2A n'és la principal (Avila, 2006; Ballatore *et al.*, 2007).

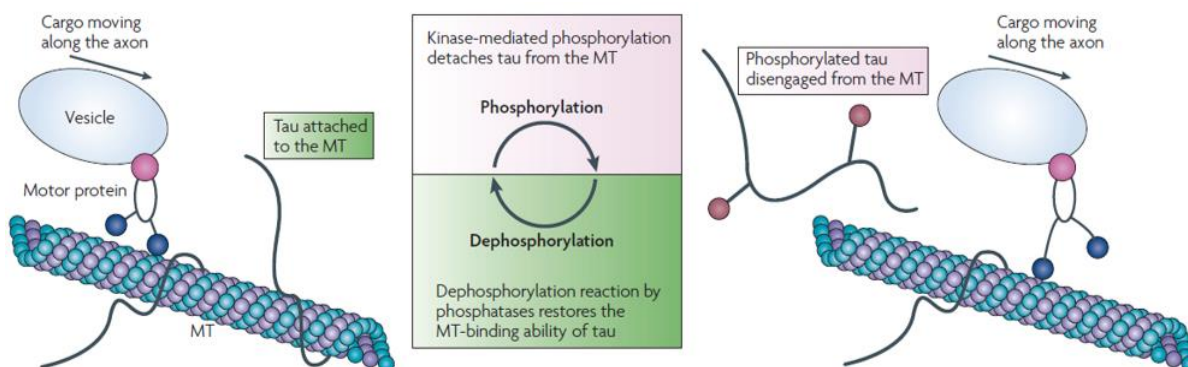


Figura 12: La importància de l'equilibri dinàmic de la unió de Tau als microtúbuls. La proteïna Tau és necessària per l'estabilització dels microtúbuls, però llavors és un impediment pel moviment de les kinesines i dineïnes al llarg de l'axó. La seva fosforilació, la separa dels microtúbuls permetent que es mogui la càrrega. L'equilibri entre les dues formes regulat per les cinases i fosfatases és imprescindible pel bon funcionament del transport axonal neuronal. Imatge obtinguda de Ballatore *et al.*, 2007.

3.1.3 Les Taupaties

El terme Taupatia va ser utilitzat per primer cop per descriure una variant genètica de l'espectre de les FTDP-17 (Spillantini *et al.*, 1997). Les Taupaties són un grup de malalties neurodegeneratives que cursen amb demència però amb manifestacions clíniques diferents. Tenen en comú l'acumulació patològica de Tau. Es divideixen en dos tipus: les primàries i les secundàries. En les primàries, l'acumulació de Tau n'és el tret neuropatològic principal. Trobem la FTDP-17, la malaltia de Pick, la Paràlisi supranuclear progressiva (PSP), la Taupatia globular Glial (GGT) i Degeneració corticobasal (CBD) entre d'altres. En les secundàries, els cúmuls de Tau coexisteixen amb el cúmul d'altres agregats proteics. Aquest grup inclou malalties neurodegeneratives on s'han descrit cúmuls de Tau, sigui per etiologia de la pròpia malaltia, com és el cas de la malaltia d'Alzheimer, o per comorbiditat amb Taupatia com alguns subtipus de Prionopatia, GSS i sCJD (Lee *et al.*, 2001; Fuster-Matanzo *et al.*, 2018). En altres malalties neurodegeneratives també s'han observat cúmuls de Tau i es podrien considerar Taupaties. És el cas de la malaltia de Parkinson (PD) (Lei *et al.*, 2010) i de la corea de Huntington (Fernandez-Nogales *et al.*, 2014).

En bastants Taupaties s'ha observat una alteració en la ràtio d'expressió de les isoformes 3R i 4R derivades de l'*splicing* de Tau. La FTDP-17, la CBD, la PSP i la GGT es consideren Taupaties amb predominança de les isoformes 4R. En canvi, la malaltia de Pick es preferentment una Taupatia 3R (Kovacs *et al.*, 2017; Fuster-Matanzo *et al.*, 2018). Aquesta desregulació de l'equilibri entre les isoformes de Tau es considera una causa de la patologia ja que afecta a la funció fisiològica de Tau. S'ha descrit que les isoformes 3R tenen menys afinitat amb els microtúbuls reduint-ne l'estabilitat, per tant un desequilibri entre els dos tipus d'isoformes altera la dinàmica dels MTs i el trànsit vesicular (Lee *et al.*, 2001).

3.1.4 Implicació de PrP^C en la malaltia d'Alzheimer

Com ja hem comentat, es va descriure la interacció de PrP^C amb l'A β en la malaltia d'Alzheimer (Lauren *et al.*, 2009). També s'han descrit certs polimorfismes a *Prnp* com un factor de risc per l'AD (Bertram *et al.*, 2007). Des de llavors, diversos grups, inclòs el nostre, hem estudiat el paper de PrP^C en la progressió i la fisiopatologia de l'AD. S'ha publicat sobre el seu paper en la toxicitat de l'A β i com a proteïna neuroprotectora enfront la patologia de l'AD. No obstant, altres grups han observat que PrP^C no participaria en la progressió de la malaltia generant debat en aquest camp (Watts *et al.*, 2018).

PrP^C com a receptor de l'A β i mediador de la seva toxicitat

S'ha postulat que la PrP^C condueix la toxicitat de l'A β . S'ha descrit que la PrP^C és necessària perquè el tractament amb oligòmers A β ₄₂ ocasionin dèficits en l'LTP en cultius organotípics d'hipocamp. Observen que en cultius *Prnp*^{0/0} i en cultius *Prnp*^{+/-} tractats amb anticossos que bloquen la PrP^C no es produeix aquesta reducció (Lauren *et al.*, 2009). Dos grups més, han descrit els mateixos resultats. Un amb cultius organotípics d'hipocamp (Nicoll *et al.*, 2013) i l'altre, *in vivo* amb rata (Freir *et al.*, 2011). També s'ha descrit que la neurotoxicitat i la mort neuronal que ocasionen els oligòmers d'A β depèn de l'expressió de la PrP^C (Kudo *et al.*, 2012). Finalment, en models murins d'AD, s'ha observat que els dèficits cognitius són dependents de l'expressió de la PrP^C (Gimbel *et al.*, 2010; Kostylev *et al.*, 2015; Salazar *et al.*, 2017).

Alguns estudis han anat més enllà descrivint que la interacció de la PrP^C amb els oligòmers d'A β indueix la toxicitat mitjançant el receptor glutamatèrgic mGluR5 i l'activació de la cinasa Fyn (Um *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014). Recentment, s'ha descrit també que mGluR5 també estaria implicat en la toxicitat de la PrP^{Sc} (Goniotaki *et al.*, 2017). S'ha postulat que la PrP^C podria ser el lligand entre l'A β i la fosforilació de Tau via la modulació de Fyn (Larson

et al., 2012). La relació directa de PrP^C amb la fosforilació de Tau ha estat observada també en un estudi transcriptòmic comparant mostres d'hipocàmp d'animals *Prnp*^{0/0} i *Prnp*^{+/+}. Van observar la desregulació de gens directament implicats en la fosforilació de Tau i el processament de l'APP (*PSEN1*, *GSK3β* i *Cdk5r1*) (Benvegnu *et al.*, 2011). Inclús, s'ha descrit la possible interacció directa de PrP^C amb Tau (Wang *et al.*, 2008).

Paper neuroprotector de PrP^C a l'AD

S'ha observat que PrP^C es troba a les plaques amiloides i que la seva expressió baixa en mostres de pacients d'AD correlacionant negativament amb la progressió de la malaltia (Ferrer *et al.*, 2001; Velayos *et al.*, 2009). A més, s'ha relacionat directament la PrP^C en la regulació negativa de l'activitat de BACE1 en el processament de l'APP (Parkin *et al.*, 2007; Griffiths *et al.*, 2012). Darrerament, s'ha descrit que la PrP^C present als exosomes del SNC agrega els oligòmers d'Aβ reduint-ne la seva toxicitat, i per tant, protegint el sistema de la propagació de la patologia (Hartmann *et al.*, 2017).

En el nostre grup hem descrit que els cúmuls d'Aβ són dependents de l'expressió de PrP^C en el model murí d'AD (APP/PS1) (Ordóñez-Gutiérrez *et al.*, 2013). En un altre treball, vam observar un augment de la fosforilació de Tau induïda per oligòmers d'Aβ en cultius primaris neuronals *Prnp*^{0/0}. Finalment, vam descriure que l'expressió de PrP^C correlaciona amb l'expressió de Tau durant l'evolució de l'AD en mostres de pacients i en el model de ratolí APP/PS1. (Vergara *et al.*, 2015). Tots aquests resultats ens fan considerar que PrP^C té un paper protector en la malaltia d'Alzheimer regulant a la baixa l'expressió i la fosforilació de Tau. Segons aquesta teoria, l'augment d'expressió de PrP^C en els primers estadis de l'AD seria un mecanisme endogen de protecció enfront la neurodegeneració derivada dels oligòmers d'Aβ que endarreriria la fosforilació patològica de Tau.

Interacció de PrP^C i l'Aβ però quelcom més?

Actualment es considera provada la interacció de PrP^C amb l'Aβ (Lauren *et al.*, 2009; Fluharty *et al.*, 2013; Rushworth *et al.*, 2013), no obstant, el paper d'aquesta interacció en la fisiopatologia de l'AD genera més controvèrsia. Alguns grups han descrit que l'efecte de la reducció de la LTP per part dels oligòmers d'Aβ és independent de PrP^C (Calella *et al.*, 2010) i també els déficits cognitius que genera (Balducci *et al.*, 2010; Cisse *et al.*, 2011). Altres treballs descriuen que, tot i que PrP^C participaria en la deficiència cognitiva en models murins d'AD, el cúmul d'Aβ és independent a l'expressió de PrP^C (Gimbel *et al.*, 2010; Salazar *et al.*, 2017).

S'ha postulat que aquests resultats contradictoris podrien provenir de l'afinitat diferencial de PrP^C amb els diferents estadis d'agregació de l'A β i de les seves mutacions. Per tant, diferències experimentals que afectin a l'estat d'agregació de l'A β i les seves mutacions podrien emascarar el paper real de PrP^C. Un treball apunta que PrP^C s'uneix dèbilment als oligòmers, amb molta afinitat a les protofibril·les i no s'uneix a les fibril·les (Nicoll *et al.*, 2013). Un altre grup ha descrit que PrP^C modula l'activitat de BACE1 processant l'APP d'expressió salvatge (APP_{wt}), però que no ho fa en el cas de l'APP amb la mutació *Swedish* (APP_{Swe}). Exposen que això ocorre perquè l'APP_{wt} es processa preferentment a les vesícules després de l'aparell de Golgi, on també hi trobem PrP^C, i en canvi, l'APP_{Swe} es processa sobretot a l'endosoma on no s'expressa PrP^C (Griffiths *et al.*, 2012). Per tant, l'ús majoritari de models murins d'AD amb la mutació APP_{Swe} (p.e. (Calella *et al.*, 2010; Cisse *et al.*, 2011)) podria emascarar el paper real de PrP^C.

Encara s'ha de definir el paper real de PrP^C en la malaltia d'Alzheimer, no obstant sembla clar que s'uneix a l'A β i que participa en la seva toxicitat regulant la fosforilació de Tau. Per tant, PrP^C es podria considerar una diana terapèutica no només per les Prionopaties, sinó també per l'AD. Tot i això, en aquests resultats contradictoris també podríem estar afectats pels *Flanking genes*.

3.2 PrP^C: receptor amiloide

Aquests resultats sobre el paper de PrP^C en la malaltia d'Alzheimer van iniciar l'estudi del paper d'aquesta proteïna en l'agregació d'altres proteïnes amiloides. Ens els darrers anys s'ha descrit PrP^C com un receptor de l' α -sinucleïna en models de Parkinson.

3.2.1 Funció de la PrP^C com a receptor de l' α -sinucleïna i la seva propagació

Recentment, s'ha descrit el paper de la PrP^C com a receptor de l' α -sinucleïna (Urrea *et al.*, 2017; De Cecco and Legname, 2018). Per primer cop, el nostre grup va descriure que fibril·les d' α -sinucleïna s'uneixen a les cèl·lules que expressen PrP^C. I que, tot i que no és imprescindible, la PrP^C regula la velocitat de propagació de les fibril·les d' α -sinucleïna *in vivo* (Urrea *et al.*, 2018). En aquesta línia, una altre treball descriu que la PrP^C participa en la recaptació de l' α -sinucleïna (Aulic *et al.*, 2017).

Seguint amb aquests resultats, s'ha descrit que la disfunció en l'LTP provocada per l' α -sinucleïna es duu a terme mitjançant la PrP^C seguint un mecanisme similar al descrit a l'AD amb els oligòmers d'A β . PrP^C interacciona amb els oligòmers d' α -sinucleïna i, a través del receptor mGluR5, fosforila Fyn. L'activació de Fyn modula l'entrada de Ca²⁺ al terminal presinàptic a través de la fosforilació de la subunitat GluN2B dels receptors d'NMDA (Ferreira *et al.*, 2017).

3.2.2 Rol de la PrP^C en l'agregació amiloide

Alguns autors han agrupat gran part de les malalties neurodegeneratives com a Proteïnopaties ja que totes tenen en comú l'agregació extra o intracel·lular de proteïnes plegades anòmalament: 1) A β a les plaques amiloides a la malaltia d'Alzheimer; 2) Tau als cabdells neurofibril·lars a totes les Taupaties; 3) α -sinucleïna als cossos de Lewy a la malaltia de Parkinson i a la demència per cossos de Lewy; 4) PrP^{Sc} als agregats amiloides a les Prionopaties; i 5) la proteïna TAR d'unió a l'ADN 43 (TDP-43) en les inclusions de l'esclerosi lateral amiotròfica. Això, ha portat a postular aquestes malalties com a patologies associades a prions (Scheckel and Aguzzi, 2018). S'ha descrit que l'A β , Tau i l' α -sinucleïna tindrien la capacitat d'autoagregar-se i propagar-se pel SNC cap a regions sanes. Fins i tot s'ha descrit la possible infecció iatrogènica en la malaltia d'Alzheimer (Jaunmuktane *et al.*, 2015). La propagació d'aquests agents proteics mal plegats correlaciona amb l'evolució de l'afectació regional en les Proteïnopaties.

S'han descrit receptors de membrana com a lligands de l'expansió d'aquestes proteïnes mal plegades, tot i que també s'ha descrit la propagació per exosomes. Els resultats que relacionen PrP^C amb els oligòmers d'A β i l' α -sinucleïna postulen que aquesta proteïna podria ser un d'aquests receptors i tenir un paper rellevant amb la patogènia de la malaltia d'Alzheimer i de la malaltia de Parkinson. Amb això, tenint en compte a més la pròpia agregació patogènica de PrP^C en les Prionopaties, s'ha considerat PrP^C com un receptor genèric per les proteïnes amiloides i com a missatger de la toxicitat en altres Proteïnopaties (Del Rio *et al.*, 2018) (Figura 13).

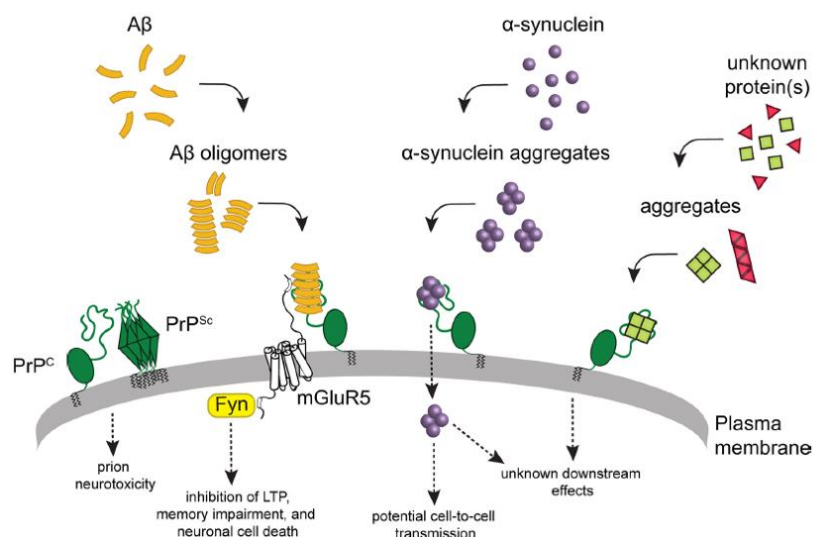


Figura 13: La PrP^C com a receptor d'agregats en diferents neurodegeneratives. La PrP^C reconeix els agregats oligomèrics de PrP^{Sc}, d'Aβ i d'α-sinucleïna i induir la seva toxicitat. Es planteja incús que tingui afinitat de reconèixer altres agregats proteics. Imatge obtinguda de Watts *et al.*, 2018.

3.4 Comorbiditat entre Prionopaties i Taupaties

En molts casos de Prionopatia, s'han descrit també cúmuls de Tau diagnosticant-se com a casos de comorbiditat amb Taupatia. A més, la presència de p-Tau en el líquid cefaloraquídi de pacients de sCJD s'ha validat com a biomarcador diagnòstic per la malaltia (Otto *et al.*, 2002; Ironside *et al.*, 2017). Això i tot el que hem comentat abans en el cas de la malaltia d'Alzheimer, ha fet pensar que PrP^C té una relació directa amb la patologia associada a Tau.

3.4.1 Relació entre Prionopaties i Taupaties

S'han descrit cúmuls de Tau en alguns casos de fCJD amb la mutació E200K (Kovacs *et al.*, 2011) i també de FFI (Jansen *et al.*, 2011). Un treball inclús observa diferents tipus de cúmuls de Tau en tots els 75 casos de sCJD que analitza (Kovacs *et al.*, 2017). La comorbiditat amb Taupatia és molt freqüent en casos de GSS. S'han descrit en pacients amb les mutacions P102L (Ishizawa *et al.*, 2002), Q217R (Hsiao *et al.*, 1992; Ghetti *et al.*, 1994), P105L (Yamazaki *et al.*, 1999; Ishizawa *et al.*, 2018), A117V (Tranchant *et al.*, 1997), Y145X (Kitamoto *et al.*, 1993), V176G (Simpson *et al.*, 2013), F198S (Hsiao *et al.*, 1992; Ghetti *et al.*, 1994) i Y218N (Alzualde *et al.*, 2010). Aquests pacients molts cops són

diagnosticats amb FTD o AD i l'estudi histopatològic *post-mortem* descobreix, a part dels agregats de Tau, els cúmuls amiloides de PrP^{Sc}.

La relació de Tau amb les Prionopaties es postula que va més enllà de la comorbiditat casual, sinó que hi ha una relació directa entre les dues malalties. Els NFTs observats en casos de GSS es troben envoltant dels agregats de PrP^{Sc} (Ishizawa *et al.*, 2002). S'ha descrit també que mutacions que cursen amb GSS o fCJD mostren una elevada capacitat d'unió a Tau (Wang *et al.*, 2008). A més, s'ha demostrat que la PrP^{Sc} augmenta la fosforilació de Tau en hàrmsters infectats amb homogenats de cervells de pacients de GSS (Wang *et al.*, 2010). Finalment, s'ha observat que la toxicitat del pèptid PrP₁₀₆₋₁₂₆ (model d'inducció de toxicitat per prions) depèn de la fosforilació de GSK3 i que aquesta augmenta la fosforilació de Tau (Perez *et al.*, 2003).

El cas GSS-Y218N

Una part d'aquesta tesi se centrarà en un nou cas de GSS comòrbid amb Taupatia. Va ser descrit el 2010 per Alzualde i col·laboradors. La clínica del pacient va començar amb dèficits de llenguatge amb afàsia no fluïda i anòmia freqüent. Els EEG mostraven indicis de possible malaltia d'Alzheimer i el pacient va ser tractat amb Galantamina (inhibidor de l'acetilcolinesterasa) i, després, amb Memantina (antagonista dels receptors d'NMDA). El seu deteriorament va ser molt ràpid i dos anys més tard el resultat al test MMSE (*Mini Mental State Examination*) va passar de 18 a 3 sobre 30 i el llenguatge presentava una important anòmia, parafàsia i ecolàlia indicant un detriment important en les seves capacitats cognitives. Quatre anys més tard, el pacient traspassava presentant una mudeesa pràcticament total, demència i mioclònies. Va ser diagnosticat com a demència familiar, possiblement AD o FTD, ja que en presentava antecedents familiars (Alzualde *et al.*, 2010).

L'anàlisi histopatològica *post-mortem* va observar atròfia al cerebel, ganglis basals i cervell. Presentava també mort neuronal i deteriorament espongiforme al còrtex temporal i frontal. En canvi, sorprenentment, presentava cúmuls de PrP^{Sc} al neocòrtex, al còrtex entorrinal, a l'hipocamp i a l'estriat. Aquests cúmuls eren majoritàriament plaques multicèntriques de PrP^{Sc} típiques de la GSS. També es van detectar abundants neurites distròfiques amb hiperfosforilació de Tau i NFTs al llarg del neocòrtex (Figura 14). El patró de bandes del WB marcant PrP després del tractament amb PK presentava un patró multibanda entre 80-20 Kda i a llarga exposició una banda a 10 Kda (Alzualde *et al.*, 2010)

Es va realitzar també l'estudi genètic degut a l'elevada prevalença de demència a la família. Es va descriure per primer cop una nova mutació al gen *Prnp*, la Y218N. Consisteix amb la substitució de la tirosina (Y) de la posició 218 per una asparagina (N). El pacient presentava

a més el polimorfisme 129VV (Alzualde *et al.*, 2010). La mutació al gen *Prnp*, el patró de bandes per WB, i sobretot, les plaques multicèntriques de PrP^{Sc} conduir a la diagnosi del pacient com un cas de GSS amb neurodegeneració fibril·lar.

Uns anys més tard, es va descriure el cas d'un familiar d'aquest pacient amb la mateixa mutació. També va ser diagnosticat per GSS, però la seva clínica era bastant diferent. Aquest pacient presentava símptomes de parkinsonisme i no de degeneració neurofibril·lar i la clínica va començar a una edat més avançada. Es va postular que la diferència podria provenir en la contribució del polimorfisme a la posició 129 en la malaltia com s'ha descrit en el vCJD. Aquest pacient és 129MV i el primer cas era 129VV (Ribosa - Nogué, 2015).

Aquest cas és important per aquesta tesi ja que es a partir del qual s'inicià el projecte que es presenta en el primer capítol. Es van extreure fibroblasts d'un familiar del pacient amb la mateixa mutació per generar per primer cop un model cel·lular per estudiar *in vitro* una Prionopatia familiar i la seva comorbiditat amb la Taupatia.

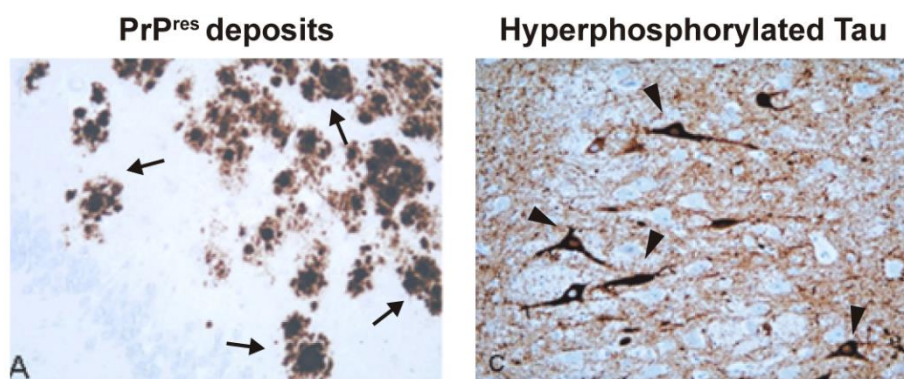


Figura 14: Anàlisi immunohistoquímica del pacient de GSS-Y218N. En aquestes seccions d'hipocamp s'observen plaques multicèntriques d'agregats de PrP^{Sc} (fletxa) i cabdells neurofibril·lars (triangles). Adaptat de Alzualde *et al.*, 2010.

3.5 Eines d'estudi de les malalties neurodegeneratives

L'estudi de les malalties neurodegeneratives es basa sobretot en les mostres *post-mortem*. Només disposem de mostres a estadis molt avançats de la malaltia després del traspàs del pacient. Això dificulta la descripció bioquímica i molecular de la progressió de la patologia. Aquesta manca de models d'estudi és sobretot rellevant en les malalties de progressió ràpida com és el cas de les Prionopaties. La diagnosi definitiva de les Prionopaties és *post-mortem* degut al ràpid traspàs dels pacients i a la l'heterogeneïtat simptomàtica. Això encara fa més complicat obtenir mostres d'estadis primaris de la malaltia.

Darrerament, s'està treballant amb mostres de líquid cefaloraquidi i de plasma sanguini de cohorts de familiars de pacients diagnosticats per intentar obtenir mostres preclíniques. No obstant, aquestes mostres ens aporten només informació puntual sistèmica d'alguns marcadors i no permeten la manipulació. Per tant, es necessita generar noves eines modulables que ens permetin estudiar les malalties neurodegeneratives per poder entendre millor la patologia i poder testar possibles tractaments.

3.5.1 De les mostres *post-mortem* a les cèl·lules mare pluripotents induïdes

La generació de les primers cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC) pel Dr. Yamanaka va canviar el paradigma de l'estudi de la fisiologia i la patologia de la biomedicina (Takahashi and Yamanaka, 2006). Gràcies al seu descobriment, actualment es poden reprogramar cèl·lules somàtiques a cèl·lules mare pluripotents que es poden mantenir en cultiu fàcilment i diferenciar a un gran ventall de cèl·lules dels tres llinatges germinals.

L'evolució d'aquest camp ha permès el cultiu de desenes de tipus cel·lulars diferents a partir de cèl·lules de pacients de malalties genètiques. A més, ha permès millorar l'estudi amb cèl·lules mare embrionàries humanes reduint molts els costos i també escapant del component ètic. Per una banda, han modificat l'aproximació experimental en moltes línies d'investigació bàsica que abans es reduïen a models de línies cel·lulars estables provinents de càncers o cultius primaris animals que estaven lluny de la realitat del pacient. Per l'altra, han permès mimetitzar en una placa de cultiu l'evolució cel·lular de tot tipus de patologies i permetre l'estudi de casos de pacients concrets que permetin una medicina personalitzada.

En aquesta tesi he generat per primer cop un model d'estudi *in vitro* per les Prionopaties amb iPSC provinents d'un pacient amb GSS amb la mutació Y218N (Alzualde *et al.*, 2010). Com hem explicat anteriorment, és un cas on el pacient sofria GSS amb neurodegeneració fibril·lar mostrant comorbiditat amb Taupatia. A continuació explicarem breument com es generen i caracteritzen les iPSC i el seu ús en malalties neurodegeneratives per contextualitzar el nostre projecte.

Generació i caracterització de les iPSC

El protocol de reprogramació que s'utilitza actualment es basa en el descrit pel doctor Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, 2006). Normalment es parteix de fibroblasts o queratinòcits dèrmics, tot i que s'ha aconseguit també a partir de cèl·lules sanguínies, de la polpa dental i cèl·lules de l'epiteli renal (Mertens *et al.*, 2016). El protocol exacte depèn de l'origen de les cèl·lules i de la mutació que tinguin, però explicarem a grans trets de que es tracta. A més comentarem la caracterització de les iPSC generades ja que és important garantir que siguin realment pluripotents i no teratogèniques.

A grans trets, la seva reprogramació s'aconsegueix expressant quatre factors de transcripció que s'expressen a les ESC o en tumors augmentant la seva capacitat proliferativa, l'anomenat còctel de Yamanaka: *Oct4*, *KLF4*, *SOX2* i *c-Myc* (alguns protocols actuals han demostrat que *c-Myc* no és necessari). L'expressió es duu a terme per infecció vírica per garantir la internalització dels transgens. Després de la infecció, se seleccionen les colònies que han adquirit morfologia d'ESC i són positives pel marcatge de la fosfatasa alcalina, enzim notòriament expressat en les ESC que ens serveix de marcador (Aasen *et al.*, 2008; Raya *et al.*, 2010).

El següent pas és demostrar que són pluripotents. Generalment per immunocitoquímica es detecten marcadors de pluripotència com els factors de transcripció *Oct4*, *Sox2* i *Nanog* i les proteïnes de membrana SSEA-3 i TRA1-81. També convé demostrar que els factors de transcripció inserits no s'expressen de forma constitutiva un cop les cèl·lules ja estan reprogramades per evitar proliferació excessiva i teratogènesi (Aasen *et al.*, 2008; Raya *et al.*, 2010). A continuació, es comprova per seqüenciació que la reprogramació no hagi afectat al genoma de les cèl·lules i que encara mantinguin la mutació del pacient. Després s'ha de demostrar que són capaces de generar cèl·lules dels tres llinatges germinals. Afegint diferents combinacions de factors al medi es diferencien les cèl·lules al llinatge endodèrmic, mesodèrmic i ectodèrmic. I finalment, s'ha de verificar la seva capacitat pluripotent observant si són capaces de generar un teratoma *in vivo* a animals immunodeprimits (Aasen *et al.*, 2008; Raya *et al.*, 2010). Si tots aquestes proves es compleixen, les cèl·lules es poden començar a diferenciar al tipus cel·lular que interessi.

Diferenciació neuronal de les iPSC

La diferenciació de les iPSC a neurones ha estat àmpliament utilitzada en la darrera dècada. Se n'han descrit molts protocols i s'han aconseguit generar diversos subtipus de neurona i glia. Explicarem els trets característics dels protocols més utilitzats tant de diferenciació "directa" com indirecta. S'anomena diferenciació "directa" perquè no es passa

per un estadi de progenitors amb una diferenciació intermèdia, directament es diferencia al cultiu neural. En el cas dels protocols indirectes es generen diferents tipus de precursors neurals (*NPs*) intermediaris amb capacitat proliferativa que mimetitzen el que ocorre durant el desenvolupament del SNC. El mètode “directe” mètode és més curt, permet que el cultiu es pugui mantenir més temps i redueix la seva manipulació. En canvi, la diferenciació indirecta és més tediosa de dur a terme, requereix més manipulació però genera *NPs* que es poden mantenir durant més temps per reproduir els experiments sense haver de tornar a l'inici (Mertens *et al.*, 2016). Els dos tipus de protocols són vàlids i complementaris, ja que ens permeten adaptar-nos a necessitats experimentals diferents.

En els protocols indirectes, la inducció dels canvis es produeix modificant el medi de cultiu en cada pas entre els progenitors intermediaris. Es van afegint factors de creixement i morfògens, i seleccionant les colònies que s'adapten i es diferencien. El còctel de factors concret depèn del tipus neuronal que es vulgui generar. Per exemple en el protocol emprat en aquesta tesi utilitza el factor de creixement de fibroblasts humà per induir la diferenciació de les *iPSC* als primers *NPs*. Aquests *NPs* es seleccionen manualment per la seva morfologia i s'afegeix N2 per amplificar-los. Finalment, un cop els *NPs* són madurs, s'indueix la seva diferenciació neuronal canviant el medi a Neurobasal suplementat amb N2 i B27 (Cho *et al.*, 2008). En canvi, en els protocols directes de diferenciació se sembren les *iPSC* i se'ls va canviant el medi suplementat també amb diferents morfògens i factors de creixement sense manipular-les pràcticament (Espuny-Camacho *et al.*, 2013).

iPSC en l'estudi de les malalties neurodegeneratives

Seguint diferents protocols, actualment s'han generat *iPSC* procedents de pacients amb diverses malalties neurodegeneratives tant lligades a mutacions com esporàdiques: malaltia d'Alzheimer (Israel *et al.*, 2012), malaltia de Parkinson (Soldner *et al.*, 2009; Sanchez-Danes *et al.*, 2012), corea de Huntington (Jeon *et al.*, 2012), demència frontotemporal (Iovino *et al.*, 2015) i esclerosi lateral amiotròfica (Zhang *et al.*, 2015). No obstant, fins al moment, no s'ha generat cap model d'*iPSC* procedent d'un pacient amb Prionopatia.

OBJECTIUS

Durant la primera meitat del segle XX ja es van descriure els primers pacients que sofrien el que actualment coneixem com a Prionopaties. Eren casos de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921), la Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (Gerstmann, 1928) i el Kuru (Gajdusek and Zigas, 1957). A finals dels anys 50, alguns autors van apuntar que aquestes diferents malalties podrien estar relacionades ja que presentaven patrons histopatològics semblants (Hadlow, 1959). No obstant, fins el descobriment del prió (PrP^{Sc}) com l'agent causant de totes elles, no es va demostrar que compartien etiologia (Prusiner, 1982). Els resultats del Dr. Stanley Prusiner van permetre descobrir que el prió provenia del plegament aberrant de la proteïna priònica (PrP^C) i que el seu cúmul al SNC era la causa de la degeneració observada en les Prionopaties. A més, va redefinir el concepte d'agent infeccios i de la codificació de la informació molecular. Per primer cop, es va descriure que una proteïna era capaç de transmetre informació a altres proteïnes modificant-ne l'estructura i que aquesta transmissió era indispensable per la capacitat infectiva de la PrP^{Sc}.

Pocs anys després del descobriment de la PrP^C, Europa va sofrir l'epidèmia d'encefalopatia espongiforme bovina (Wells *et al.*, 1987). Inesperadament, la ingesta de material procedent d'aquestes vaques malaltes va infectar alguns centenars de persones que mostrarien la patologia una dècada després (Will *et al.*, 1996). Aquesta crisi sanitària va posar de manifest la capacitat infectiva dels prions entre espècies i va convertir l'estudi de la biologia de la PrP^C en un tema de salut pública. Als anys 90, es van generar els primers models de ratolí deficient per la PrP^C (*Prnp*^{0/0}) com a eines d'estudi (Büeler *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1994). Emprant aquests models es va demostrar que la presència de la PrP^C endògena era indispensable per la infectivitat de les Prionopaties (Büeler *et al.*, 1993). Aquests resultats van postular que la patogènia d'aquestes malalties provindria tant del guany de funció patològica de la PrP^{Sc} degut al seu plegament anòmal i agregació, com de la pèrdua de la funció fisiològica de la PrP^C ja que perdria la seva conformació nativa. Aquesta hipòtesi va derivar en una doble focalització en la recerca sobre les Prionopaties. Per una banda, l'estudi de les causes i conseqüències de l'adquisició de la conformació patogènica *scrapie*, la PrP^{Sc}; i per l'altra, la cerca de les funcions fisiològiques de la PrP^C nativa (Westergard *et al.*, 2007). En aquest segon punt s'emmarca aquest projecte de tesis.

A continuació, es resumirà l'estat del coneixement sobre la proteïna priònica quan es va iniciar aquest projecte de tesis per emmarcar i raonar-ne els objectius. El rol fisiològic de

Objectius

PrP^C no estava definit clarament. S'havia descrit que s'expressava en el terminal sinàptic on semblava regular la neurotransmissió glutamatèrgica (Khosravani *et al.*, 2008) i participava en la patogènia de la malaltia d'Alzheimer (Lauren *et al.*, 2009), entre altres coses. No obstant, no hi havia consens sobre el paper real de PrP^C ja que diferents grups havien publicat treballs controvertits i inclús amb resultats oposats.

La manca de reproductibilitat entre diferents grups va fer reconsiderar els models d'estudi que s'havien utilitzat. En aquell moment, van aparèixer dues publicacions que van demostrar que s'havien estat comparant models de ratolí erròniament. Per una banda, Striebel i col·laboradors van descriure que PrP^C no exercia cap funció neuroprotectora enfront epilèpsia com havien descrit altres grups (Walz *et al.*, 1999; Rangel *et al.*, 2007). Postulaven que els resultats que s'havien observat anteriorment provenien de la comparació entre models que presentaven fons genètics mixtes i per tant no eren controls perfectes (Striebel *et al.*, 2013b). Un altre treball del mateix any va demostrar l'existència d'aquestes diferències de fons genètic entre els ratolins deficients per a PrP^C i els seus controls. Demostrava que l'animal ZHI-*Prnp*^{0/0} presentava polimorfismes diferents al seu control *Prnp*^{+/+} en els gens que flanquejaven la deleció de PrP^C. Això s'havia arrossegat de la implantació de cèl·lules embrionàries de fons 129Sv en una femella C57Bl6 durant la transgènesi. Això feia la seva comparació imperfecta ja que l'animal control d'expressió salvatge no presentava part del genoma 129Sv i el *Prnp*^{0/0} sí, fenomen que podria emascarar el paper real de PrP^C. En el mateix treball demostraven que aquestes diferències en el fons 129Sv havien provocat la definició errònia de PrP^C com a reguladora de la fagocitosi (Nuvolone *et al.*, 2013). Aquests dos treballs van fer replantejar vint anys d'estudi de les funcions de PrP^C ja que el model ZHI havia estat l'utilitzat en la majoria de treballs.

En aquest context, comença el projecte de la present tesis. L'objectiu principal és elucidar el paper de PrP^C en neurotransmissió, neuroprotecció i neurodegeneració per entendre les conseqüències de la pèrdua de funció de PrP^C en les Prionopaties. El projecte comença en el marc d'aquests resultats contradictoris i la manca de models d'estudi que acabem de comentar. En conseqüència, la primera part d'aquesta tesi s'ha centrat en generar i caracteritzar nous models *in vitro* i *in vivo* per estudiar la PrP^C i defugir de la controvèrsia sobre els models anteriors. Un cop hem obtingut les eines d'estudi, ens hem centrat en el paper de la PrP^C en: 1) la regulació de la proteïna Tau i la seva patogènia; 2) la neuroprotecció epilèptica; i 3) la neurotransmissió hipocàmpica i el comportament. D'aquest projecte se n'han derivat tres publicacions que presentem en aquesta tesis.

En primer lloc, ens hem centrat en la **generació i caracterització del primer model d'*iPSC* procedents d'un pacient de Prionopatia amb comorbiditat amb Taupatia**. Aquest projecte s'inicia a partir de la descripció d'una família a Euskadi amb una nova mutació (Y218N) al gen de la PrP^C. El pacient presentava demència i símptomes extrapiramidals. La diagnosi *post-mortem* fou de GSS amb neurodegeneració fibril·lar amb cúmuls de Tau (Alzualde *et al.*, 2010). Aquest cas ens va permetre iniciar un projecte pioner sobre la generació del primer model *in vitro* provinent d'un pacient de Prionopatia que ens permetés l'estudi tant de la malaltia com de les funcions de PrP^C. La tecnologia de les *iPSC* estava en augment i feia pocs anys que s'havien generat els primers models de les malalties neurodegeneratives majoritàries, la malaltia d'Alzheimer i la de Parkinson, amb un gran factor d'impacte (Soldner *et al.*, 2009; Israel *et al.*, 2012). No obstant, en el cas de les malalties minoritàries, el camp encara era incipient. Aquesta eina ens permetria estudiar una de les funcions de PrP^C de més interès, la seva participació en la fosforilació i patogènia de Tau (Larson *et al.*, 2012). Per una banda, generariem un model únic que s'aproximaria molt a la fisiologia dels pacients, i per l'altra, defugiríem de la problemàtica sobre els models d'estudi de PrP^C controvertits.

Es va iniciar una col·laboració entre diversos grups per realitzar aquest projecte. El grup del Dr. Àngel Raya (CMRB, Barcelona) s'encarregaria de la generació i caracterització de les *iPSC*. Els experiments d'infectivitat els durien a terme a Euskadi els grups de la Dra. Rosario Sanchez-Pernaute (Il·lavors Inbiomed, Donosti) i el Dr. Joaquín Castilla (CIC bioGUNE, Derio). Finalment, nosaltres, amb el recolzament tècnic del grup de la Dra. Antonella Consiglio (UB, Barcelona), caracteritzaríem la diferenciació neuronal d'aquestes *iPSC*, estudiariem la reproducció de la Taupatia i coordinariem el projecte.

Tenint en compte el que s'acaba d'explicar, en aquest capítol s'han definit els següents objectius:

Objectiu 1: Generar i caracteritzar les *iPSC* provinents del pacient amb la mutació *Prnp*-Y218N

Objectiu 2: Avaluar la reproducció el fenotip neurodegeneratiu del pacient a les neurones derivades de les *iPSC*-Y218N

Objectiu 3: Elucidar els efectes de la mutació Y218N a la viabilitat i diferenciació de les neurones de les *iPSC*-Y218N

Objectius

En segon lloc, hem avaluat la **neuroprotecció epilèptica en diferents models murins deficients per la PrP^C**. El nostre i altres grups havíem observat que els animals *Prnp*^{0/0} eren més susceptibles a la inducció epilèptica. S'havia descrit que PrP^C modulava l'activitat d'alguns receptors de glutamat i la seva absència generava una sinapsi més excitable propensa a produir crisis epilèptiques en rebre estímuls excitotòxics (Walz *et al.*, 1999; Rangel *et al.*, 2007). No obstant, com hem comentat anteriorment, Striebel i col·laboradors acabaven de publicar que amb els animals *Prnp*^{0/0} no eren més susceptibles i que les diferències provindrien del fons genètic dels ratolins (Striebel *et al.*, 2013b). Per tot això, en aquesta tesi ens vam proposar esclarir el paper real de PrP^C en la neuroprotecció epilèptica i quins dominis de la proteïna eren necessaris per exercir aquesta funció.

Aquest treball el va iniciar la Dra. Patricia Carulla al final de la seva tesi doctoral. Personalment vaig participar-hi durant les pràctiques del Grau i del Màster, i el vam concloure i publicar el meu primer any de tesi. Tenint en compte el que s'acaba d'explicar, en aquest capítol s'han definit els següents objectius:

Objectiu 1: Comparar la resposta a àcid kaïníc (KA) de diferents models de ratolí *Prnp*^{0/0}

Objectiu 2: Elucidar el paper dels polimorfismes 129Sv del model ZH1 en la neuroprotecció enfront a KA

Objectiu 3: Dilucidar la importància de l'ancoratge a membrana de PrP^C en la neuroprotecció enfront a KA

Objectiu 4: Determinar quin domini de PrP^C exerceix la seva funció neuroprotectora

La tercera i última part d'aquesta tesi comença amb l'adquisició d'un nou model de ratolí *Prnp*^{0/0}, el model ZH3. Aquest fou generat per tecnologia TALEN sota un fons estrictament co-isogènic, el C57Bl6. Es considera el model definitiu de ratolí *Prnp*^{0/0} perquè no se li ha modificat pràcticament el genoma (només 8 pb) i no presenta cap alteració transcriptòmica derivada de la transgènesi (Nuvolone *et al.*, 2016). Aquest nou model ens va obrir la porta a noves línies d'investigació més enllà de la revisió de resultats controvertits amb els anteriors models. Ens plantegem definir les funcions de PrP^C a diversos nivells: des de la sinapsi i la seva electrofisiologia a funcions cognitives elevades com l'aprenentatge i el condicionament operant. Amb aquest nou model, per tant, pretenem estudiar **el paper de PrP^C en la neurotransmissió glutamatèrgica hipocàmpica, la conducta i l'aprenentatge**.

Tenint en compte el que s'acaba d'explicar, en aquest capítol s'han definit els següents objectius:

Objectiu 1: Estudiar la conducta i l'activitat de l'animal ZH3

Objectiu 2: Avaluar les conseqüències de l'absència de PrP^C en l'aprenentatge i la memòria en tasques de Condicionament Operant

Objectiu 3: Testar la facilitació i l'excitabilitat de la via col·lateral de Schaffer *Prnp*^{0/0}

Objectiu 4: Avaluar la generació de potenciació a llarg termini (LTP) en absència de PrP^C

Objectiu 5: Estudiar la formació de xarxes, la connectivitat i l'excitabilitat de cultius primaris neuronals *Prnp*^{0/0} al llarg de la seva maduració

RESULTATS

La present Tesis Doctoral, titulada “Noves funcions de la PrP^C en neurotransmissió, neuroprotecció i neurodegeneració”, es presenta com un compendi de les següents publicacions:

Capítol I:

iPS Cell Cultures from a Gerstmann-Straussler-Scheinker Patient with the Y218N PRNP Mutation Recapitulate tau Pathology

Andreu Matamoros-Angles*, Lucía Mayela Gayosso*, Yvonne Richaud-Patin*, Angelique di Domenico, Cristina Vergara, Arnau Hervera, Amaya Sousa, Natalia Fernández-Borges, Antonella Consiglio, Rosalina Gavín, Raket López de Maturana, Isidro Ferrer, Adolfo López de Munain, Ángel Raya[#], Joanquín Castilla[#], Rosario Sánchez-Pernaute[#] i José Antonio del Río[#].

Manuscrit publicat a *Molecular Neurobiology*, 2018; 55(4): 3033–3048. Online 2017 May 2. doi: 10.1007/s12035-017-0506-6

Capítol II:

Involvement of PrP^C in kainate-induced excitotoxicity in several mouse strains

Patricia Carulla, Franc Llorens, **Andreu Matamoros-Angles**, Patricia Aguilar-Calvo, Juan Carlos Espinosa, Rosalina Gavín, Isidre Ferrer, Giuseppe Legname, Juan María Torres i José A. del Río[#].

Manuscrit publicat a *Scientific Reports*, 2015. Jul 9;5:11971. doi: 10.1038/srep11971.

Capítol III:

Behavioral deficits, learning impairment, and enhanced hippocampal excitability in prion protein knock-out mice

Andreu Matamoros-Angles, Arnau Hervera, Jordi Soriano, Eulàlia Martí, Franc Llorens, Mario Nuvolone, Adriano Aguzzi, Agnès Gruart, José M. Delgado-García i José A. del Río.

Aquest manuscrit està actualment en preparació

Cultius derivats d'iPSC provinents d'un pacient de GSS amb la mutació Y218N-Prnp recapitulen la Taupatia

Andreu Matamoros-Angles*, Lucía Mayela Gayosso*, Yvonne Richaud-Patin*, Angelique di Domenico, Cristina Vergara, Arnau Hervera, Amaya Sousa, Natalia Fernández-Borges, Antonella Consiglio, Rosalina Gavín, Rakel López de Maturana, Isidro Ferrer, Adolfo López de Munain, Ángel Raya#, Joaquín Castilla#, Rosario Sánchez-Pernaute# i José Antonio del Río#.

Resum

La síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) és una Prionopatia neurodegenerativa dominant autosòmica lligada a mutacions al gen de la proteïna prionica (PrP^C). Clínicament cursa amb ataxia, paraparesis espàstica, signes extrapiramidals, demència i, irremeiablement, la mort. Freqüentment, els pacients de GSS presenten una patologia mixta amb comorbiditat amb Taupatia. En aquest treball, es desenvolupa un model de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC) derivades de fibroblasts d'un pacient de GSS amb Taupatia, així com d'un control saludable emparellat de sexe i edat. El pacient presenta la mutació Y218N recentment descrita. Els cultius neuronals derivats de les iPSC Y218N mostren una astrogliosi rellevant, un augment de p-Tau, un transport associat a microtúbuls reduït i mort cel·lular apoptòtica. Per una banda, els nostres resultats reproduïxen la patologia de la Taupatia. Tanmateix, no van generar prió resistent a proteinasa K. En aquest estudi, aportem, per primera vegada, un model neuronal derivat directament d'un pacient que permetrà investigar la GSS i els fenotips relacionats també amb la Taupatia.

Referència

Matamoros-Angles A, Gayosso LM, Richaud-Patin Y, di Domenico A, Vergara C, Hervera A, Sousa A, Fernandez-Borges N, Consiglio A, Gavin R, Lopez de Maturana R, Ferrer I, Lopez de Munain A, Raya A, Castilla J, Sanchez-Pernaute R, Del Rio JA (2018) *iPS Cell Cultures from a Gerstmann-Straussler-Scheinker Patient with the Y218N PRNP Mutation Recapitulate tau Pathology*. Mol Neurobiol 55:3033-3048.



iPS Cell Cultures from a Gerstmann-Sträussler-Scheinker Patient with the *Y218N PRNP* Mutation Recapitulate tau Pathology

Andreu Matamoros-Angles^{1,2,3,4} · Lucía Mayela Gayosso^{5,6,7} · Yvonne Richaud-Patin^{8,9} · Angelique di Domenico^{10,11} · Cristina Vergara^{1,2,3,4,12} · Arnau Hervera^{1,2,3,4} · Amaya Sousa⁵ · Natalia Fernández-Borges^{6,7,13} · Antonella Consiglio^{10,11,14} · Rosalina Gavín^{1,2,3,4} · Raket López de Maturana⁵ · Isidro Ferrer^{3,4,11} · Adolfo López de Munain^{15,16,17} · Ángel Raya^{8,9,18} · Joaquín Castilla^{6,7} · Rosario Sánchez-Pernaute^{5,19} · José Antonio del Río^{1,2,3,4}

Received: 7 December 2016 / Accepted: 21 March 2017 / Published online: 2 May 2017
© The Author(s) 2017. This article is an open access publication

Abstract Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) syndrome is a fatal autosomal dominant neurodegenerative prionopathy clinically characterized by ataxia, spastic paraparesis, extrapyramidal signs and dementia. In some GSS familiar cases

carrying point mutations in the *PRNP* gene, patients also showed comorbid tauopathy leading to mixed pathologies. In this study we developed an induced pluripotent stem (iPS) cell model derived from fibroblasts of a GSS patient harboring the

Andreu Matamoros-Angles, Lucía Mayela Gayosso, and Yvonne Richaud-Patin contribute equally to this study.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12035-017-0506-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ángel Raya
araya@cmrb.eu

✉ Joaquín Castilla
castilla@joaquincastilla.com

✉ Rosario Sánchez-Pernaute
rosario.sanchez.pernaute@juntadeandalucia.es

✉ José Antonio del Río
jadelrio@ibecbarcelona.eu; jadelrio@ub.edu

¹ Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac 15-21, E-08028 Barcelona, Spain

² Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

³ Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona, Spain

⁴ Institute of Neuroscience, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁵ Stem cells and neural repair laboratory, Fundación Inbiomed, San Sebastian, Gipuzkoa, Spain

⁶ Proteomics unit (Prion lab), CIC bioGUNE, Parque tecnológico de Bizkaia, 48160 Derio, Bizkaia, Spain

⁷ IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Bizkaia, Spain

⁸ Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona, c/ Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain

⁹ Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBERBBN), Madrid, Spain

¹⁰ Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

¹¹ Dept. Patologia i Terapèutica Experimental, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

¹² Present address: Laboratory of Histology, Neuroanatomy and Neuropathology (CP 620), ULB Neuroscience Institute. Université Libre de Bruxelles, Faculty of Medicine, Brussels, Belgium

¹³ Present address: CISA-INIA, Center for Animal Health Research, Madrid, Spain

¹⁴ Department of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, Brescia, Italy

¹⁵ Instituto Biodonostia-Hospital Universitario Donostia, San Sebastian, Gipuzkoa, Spain

¹⁶ Neurosciences Department, University of the Basque Country UPV-EHU, Bilbao, Spain

¹⁷ Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), San Sebastian, Gipuzkoa, Spain

Y218N PRNP mutation, as well as an age-matched healthy control. This particular *PRNP* mutation is unique with very few described cases. One of the cases presented neurofibrillary degeneration with relevant Tau hyperphosphorylation. *Y218N* iPS-derived cultures showed relevant astrogliosis, increased phospho-Tau, altered microtubule-associated transport and cell death. However, they failed to generate proteinase K-resistant prion. In this study we set out to test, for the first time, whether iPS cell-derived neurons could be used to investigate the appearance of disease-related phenotypes (i.e. tauopathy) identified in the GSS patient.

Keywords Gerstmann-Sträussler-Scheinker · Induced pluripotent stem cells · Tau · Cellular prion protein

Introduction

Biomedical research on neurodegenerative diseases with low prevalence in humans relies on the possibility of analyzing brain samples only at very late stages of the disease. Thus, our view of the biochemical or molecular changes during the disease is partial. This drawback steadily increases with a faster neurodegenerative progression speed (e.g., in prionopathies [1] or rapid Alzheimer's disease [2]). This is also the case for most sporadic tauopathies and in most cases of frontotemporal lobar degeneration (FTLD) displaying neurofibrillary degeneration [3, 4]. This limitation impedes the study of early onset changes in asymptomatic patients, making it impossible to investigate illness evolution, therefore hampering biochemical/molecular studies and drug discovery [5].

Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS) is a rare autosomal dominant neurodegenerative prionopathy clinically characterized by a wide spectrum of manifestations including but not limited to ataxia, spastic paraparesis, extrapyramidal signs and dementia [6, 5]. Most GSS patients have the *P102L* mutation in the cellular prion protein (PrP^C) gene (*PRNP*) located in the short arm of chromosome 20 [5]. Cases of rapid progressive forms of GSS are rare [7] with an average duration after clinical diagnosis of 5–6 years (from 6 months to 13 years) [8, 5]. Histopathological examination of post-mortem GSS brains has revealed abnormal misfolded prion (PrP) aggregates in the form of unicentric and multicentric deposits in the cerebellum and cortical gray matter [5]. In addition, western blot analysis of aggregated PrP is distinguished by the presence of truncated protein fragments ranging between 6 and 10 kDa and a variable number of bands of higher molecular weight [9]. Parallel to this particular PrP

deposition, pathological features characteristic of other neurodegenerative diseases such as parkinsonism or Alzheimer's disease have been observed in some GSS patients [5]. Indeed, an increase in hyperphosphorylated Tau is frequently observed in the pathological analysis of brains from GSS patients carrying *PRNP* mutations *P102L* [10], *P105L* [11], *A117V* [12], *V176G* [13], *F198S* [14, 15], *Q217R* [16, 15] and *Y218N* [17]. Although it has been shown that PrP^C with the *P102L* mutation display an increased binding to Tau [18], the role of these point mutations in the development of neurofibrillary degeneration is unknown. Nevertheless, in some *P102L* GSS cases with increased levels of p-Tau, the distribution of p-Tau tangles close to PrP deposits suggesting an active participation of PrP in the generation of p-Tau [10].

Due to the above-mentioned restrictions in this study we explored the usefulness of an induced pluripotent stem (iPS) cell model derived from somatic cells from a GSS patient. iPS cell technology is a tool for basic and translational research through generating in vitro models of disease-relevant cells reprogrammed directly from patients [19–21]. This approach has been shown to be particularly useful in the case of congenital or early-onset monogenic diseases [22] as well as other neurodegenerative diseases [23]. iPS cells have been generated from patients with Alzheimer's [24], Parkinson's [25, 26], Huntington's [27] diseases as well as FTLD [28], Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) [29] and several others. However, there are no reports of iPS cell lines derived from patients with familial prionopathies.

In this study, we generated iPS cells from dermal fibroblasts of a family member of the *Y218N* GSS patient described by Alzualde and colleagues [17] and differentiated them into neurons using two previously published procedures [30, 31]. To date, very few individuals have been reported carrying this mutation [17, 32]. We were interested in this family since the *Y218N* patient displayed widespread neurofibrillary degeneration in the brain [17]. Results determined that although differentiated *Y218N* iPS cells were not able to spontaneously generate or propagate human prions, *Y218N*-derived cultures showed relevant astrogliosis and cell death. In addition, differentiated *Y218N*-derived neurons displayed high levels of p-Tau, thus recapitulating most of the neuropathological features reported in the patient [17].

Material and Methods

Case Patient The index case and the younger sister was examined at the Cognitive Disorders Unit at Donostia Hospital. The clinical report of the family and the *Y218N* patient can be seen in [17]. Dermal fibroblasts were obtained from the younger sister of the *Y218N* patient (54 years old in 2010) after having made complaints of poor concentration, apathy, emotional lability, and increasing difficulties in planning and

¹⁸ Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain

¹⁹ Present address: Andalusian Initiative for Advanced Therapies, Junta de Andalucía, Seville, Spain

executing actions. She had previously been diagnosed with and treated for a depressive illness, and the neuropsychological examination revealed slight memory dysfunction in retrieval, language impairment followed by anomia with preserved verbal comprehension, and executive dysfunction. The Mini Mental State Examination (MMSE) score was 23/30. Magnetic resonance imaging showed slight frontotemporal atrophy and EEG analysis revealed intermittent frontotemporal delay. An additional EEG, 6 months later, showed slow background activity in the patient, with intermittent delta waves in the left hemisphere. 10 months after onset, she had language difficulties, with impairment in semantic knowledge, and MMSE score dropped to 13/30.

Generation of iPS Cells All experiments were performed under the guidelines and protocols of the Ethical Committee for Animal Experimentation (CEEAA) of the University of Barcelona. All procedures adhered to internal and EU guidelines for research involving derivation of pluripotent cell lines. All subjects gave informed consent for the study using forms approved by the Ethical Committee on the Use of Human Subjects in Research at Hospital Donostia in San Sebastián, Spain. Generation of iPSC lines was approved by the Advisory Committee for Human Tissue and Cell Donation and Use, by the Commission on Guarantees concerning the Donation and Use of Human Tissues and Cells of the Carlos III Health Institute, Madrid, Spain (Ref: 589, 1/21/2015). All procedures were done in accordance with institutional guidelines and the cell lines have been (or will be) deposited at the Banco Nacional de Lineas Celulares (BNLC, ISCIII) following the Spanish legislation. Fibroblasts from a healthy individual and from the *Y218N* GSS patient were infected with retroviruses carrying human cDNA coding for *KLF4*, *SOX2*, and *OCT4*, with or without the addition of *c-MYC* as previously described [33]. Fibroblasts were maintained in DMEM (Sigma) supplemented with 10% FBS (Life Technologies) and 1% Pen/Strep solution (Life Technologies) before infection. After infection, fibroblasts were plated on irradiated human foreskin fibroblasts (HFF, ATCC) and maintained with hESC medium for 4–12 weeks until iPS cell colonies appeared. Several clones from each cell line were obtained and validated. *Y218N* patient (FH10) and parallel control (FHB1) iPS cell clones were analyzed in details (see below).

Characterization of iPS Cell Lines AP staining was performed using the Alkaline Phosphatase Blue Membrane Substrate Solution (Sigma). For immunocytochemistry, cells were grown on HFF feeder layers for 6–10 days and then fixed in 4% PFA for 10 min. After embryonic bodies (EB) formation, differentiation into the 3 germ layers was performed. For endoderm, EBs were plated on 6-well plates treated with Matrigel (BD Biosciences) for 1 h at room temperature, and maintained for 28 days with EB medium. The same procedure

was used for mesoderm, but instead using EB medium with 0.5 mM of ascorbic acid. For ectoderm differentiation, EBs were maintained in suspension for 10 days with Neurobasal medium containing N2, B27 and FGF2 (N2B27 medium), prepared as previously described [26]. EBs were then plated on 6-well Matrigel-coated plates and maintained for 21 days with N2B27 medium without FGF supplementation. Differentiated cells were fixed in 4% PFA for 10 min. For nuclear DAPI staining (Invitrogen), 0.5 µg/ml was used. The slides were mounted with PVA:DABCO mounting medium. Images were acquired with an SP2 confocal system (Leica) and analyzed with ImageJ™ software. RT-qPCR analysis was performed as previously described [26]. All results were normalized to the average expression of Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). Transcript-specific primers used are shown in Supplementary Table 1.

For karyotyping, iPS cells were grown on Matrigel and treated with colcemid (Life Technologies) at a final concentration of 20 ng/ml. Karyotyping analysis was carried out by Prenatal Genetics S.L. (Barcelona). For promoter methylation, testing reprogramming gene integration and sequencing to confirm that patient iPS cells were carrying mutations in *PRNP* gene, DNA was isolated using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. Bisulfite conversion of the promoters was carried out using the Methylamp DNA modification kit (Epigentek). Five clones of each promoter for each cell line were analyzed by sequencing. The primers used for testing gene integration are shown in Supplementary Table 1.

iPS Cell Differentiation to Neural Cells In this study, two protocols were used to differentiate the iPS cells. In the first protocol, iPS cell colonies were mechanically passaged onto Matrigel-coated 6-well plates. 24 h later the mTeSR™ was replaced by DDM neural induction medium [34, 35] with the addition of the ALK inhibitor, SB431542 at 10 mM for 4 days (Tocris) and the BMP inhibitor, LDN-193189 at 100 nM (Milenyi Biotech) for 12 days. Cells were propagated in this medium for 3 weeks. At about 24 days in vitro, cells were dissociated and plated onto wells coated with poly-L-lysine (33.3 mg/ml, BD) and laminin (3.3 mg/ml, BD), and the medium was changed to N2B27 medium. For immunofluorescence, neurons were dissociated with Accutase (Sigma) and replated on glass coverslips coated with poly-L-lysine and laminin. Characterization was done as previously described [36].

In the second procedure, spherical neural masses (SNMs) were obtained as previously described [37]. SNMs were fixed in 4% phosphate buffered paraformaldehyde (PFA) for 2 h and characterized by immunostaining. For nuclear DAPI staining (Invitrogen), 5 µg/ml was used. Mounting medium and imaging analysis were performed for in vitro differentiation testing. SNMs obtained from control and *Y218N* iPS cells, having

been maintained in suspension, were then plated on slide-flasks, 6-well plates, 35 mm Ø plates or 10 mm Ø plates all previously treated with Matrigel for 1 h at room temperature, and differentiated for 3, 6 or 9 weeks with N2B27 [26], without FGF supplementation to obtain neural cultures. The correct differentiation was assessed by immunostaining. Antibodies used are shown in Supplementary Table 2. For nuclear DAPI staining (Invitrogen), 0.5 µg/ml was used. The slides were mounted with Mowiol mounting medium.

RT-PCR Protocol Quantitative real time PCR was performed on total RNA extracted with mirVana's isolation kit (Ambion) from differentiating iPS cells. Purified RNAs were used to generate the corresponding cDNAs, which served as PCR templates for mRNA quantification. Quantitative RT-PCR assays were performed in duplicate on cDNA samples obtained from the retro-transcription reaction diluted 1:20 in 384-well optical plates (Kisker Biotech) using the ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The reactions were carried out using 20xTaqMan gene expression assays for genes and 2xTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). The reactions were conducted using the following parameters: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The fold change was determined using the eq. $2^{-\Delta\Delta CT}$. Primers used in iPS cell differentiation experiments and Tau R3/R4 analysis can be seen in Supplementary Table 3.

Sample Collection and Proteinase K Treatment Samples of control and Y218N differentiating cultures were collected at several differentiation times and were homogenized in 10% lysis buffer (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, and 10 mM Tris, pH 7.5). Debris was removed with low-speed centrifugation at 3000×g for 10 min, and the supernatants were collected. To detect the presence of Proteinase K (PK)-resistant PrP in the supernatant, homogenates were digested with a final concentration of 10–50 µg/ml PK at 37 °C for 60 min prior to western blot analysis using 3F4 antibody against PrP^C. To evaluate the PK resistance of protein samples from the original Y218N patient [17], type I sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) and Type II sCJD brain homogenates were also processed in parallel. PK digestion was terminated by adding Laemmli buffer and heating the samples at 100 °C for 10 min.

Western Immunoblot Samples from different differentiation stages from iPS cells to neuronal cultures were processed for western blot, including human post-mortem samples and control cultured cells. The collected samples were homogenized in (10% wt/vol) of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4/150 mM NaCl/0.5% Triton X-100/0.5% Nonidet P-40 and a mixture of proteinase inhibitors. After this, samples were centrifuged at 15,000 × g for 20 min at 4 °C. The resulting supernatant was

normalized for protein content using BCA kit (Pierce). Cell extracts containing Laemmli buffer were boiled at 100 °C for 10 min, followed by 8–10% SDS electrophoresis, then electrotransferred to nitrocellulose membranes for 2 h at 4 °C. Membranes were then blocked with 5% not-fat milk in 0.1 M Tris-buffered saline (pH. 7.4) for 2 h and incubated overnight in 0.5% blocking solution containing primary antibodies. After incubation with peroxidase-tagged secondary antibodies (1:2000 diluted), membranes were revealed with ECL-plus chemiluminescence western blot kit (Amersham-Pharmacia Biotech). In our experiments, each nitrocellulose membrane was used to detect p-Tau (AT-8 and PHF1 antibodies), Actin, Tubulin as protein loading controls. A list of the antibodies used in these experiments can be seen in Supplementary Table 2.

Densitometry and Statistical Processing For quantification, developed films were scanned at 2400 × 2400 dpi (i800 MICROTEK high quality film scanner), and the densitometric analysis was performed using Quantity One Image Software Analysis (Biorad). Statistical analysis of the obtained data (RT-qPCR and Western blot) was performed using Bonferroni post hoc test (Multiple comparison test) using GraphPad Prism 6 (Mac OSX, Graphpad). Data are presented as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). Differences between groups were considered statistically significant between **** $P < 0.001$, *** $P < 0.01$ and ** $P < 0.05$.

Immunohistochemistry Differentiating iPS cell cultures were fixed in 4% PFA at different days in culture and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma) in 0.1 M PBS. After fixation, and extensive rinsing with 0.1 M PBS, cultures were blocked with 10% FBS in 0.1 M PBS prior to incubation with primary antibodies (see Supplementary Table 2). After incubation with primary antibodies, cells were incubated with the pertinent Alexa Fluor-tagged secondary antibodies (Alexa-488 goat anti-mouse or Alexa-568 goat anti-rabbit) (Invitrogen-Life Technologies). Finally, cells were stained with 0.1 µM DAPI (Sigma) diluted in 0.1 M PBS, mounted on Mowiol, and viewed using an Olympus BX61 fluorescence microscope, Zeiss LSM or a Leica SP5 confocal microscopy.

Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) Measurement CTCF levels of p-Tau (red channel) and MAP2 (green channel) were measured in 150 (Y218N) and 165 (control) identified neurons after 21 days of differentiation using ImageJ™ software following published instructions <http://sciencetechblog.com/2011/05/24/measuring-cell-fluorescence-using-imagej/>. See also [38] for details. CTCF values were determined using the following formula. CTCF = Integrated Density – (Area of selected cell × Mean fluorescence of background readings). Statistical analysis of the obtained data was performed using Mann-Whitney U test

using GraphPad Prism 6 (Mac OS X, GraphPad). Differences between groups were considered statistically significant between *** $P < 0.001$.

Mitochondrial Movement Analysis in iPS Cell-Derived Neurons SNM-derived neurons were incubated after 21 days of differentiation with MitoTracker (Molecular Probes) and filmed using a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica) equipped with a 63× immersion oil objective. Time-lapse series of image stacks composed of 10 images (512×512 pixels) were taken every 3 s over 10 min. Movies were generated at 10 frames per second. Forty-two axons were registered and analyzed in each group recorded. In all cases, a mitochondrion was considered motile when it moved more than $0.5 \mu\text{m}$ during 1 min of recording. Distances and speeds of retrograde and anterograde transport were measured, and no tracking plugging was used. ImageJ™ software was used to quantify mitochondrial movement. For each mitochondrion movement, the minimum displacement and the average over time were plotted. Statistical analysis of the obtained data was performed using Mann-Whitney U test using GraphPad Prism 6 (Mac OS X, GraphPad). Differences between groups were considered statistically significant between *** $P < 0.01$ and ** $P < 0.05$.

Infectivity Assay Brain homogenates (10% in sterile PBS) were made fresh the day of the infection. One aliquot was kept frozen at -80°C to repeat the exposure 72 h after the first infection, as described [39]. Representative samples were taken to confirm the presence of PK-resistant PrP in the homogenates, following digestion with $50 \mu\text{g/ml}$ for scrapie (263 K) and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) brains and $12.5 \mu\text{g/ml}$ for the *Y218N* brain [40]. Control and *Y218N* forebrain neuronal cultures were infected at early (30–40) and middle (60–80) differentiation times. Neurons were replated 5–6 days before the experiment. The culture supernatant was replaced by fresh media containing 10% brain homogenate (day 1) and this was repeated 72 h later (day 3). Two days later, fresh medium (without inocula) was added without removing the supernatant. At day 10 post-inocula (dpi) the entire medium was replaced and the cells were washed several times with sterile PBS before adding fresh Neurobasal containing B27 and N2 supplements. Medium was replaced every other day for the first 2 weeks and then twice a week until cells were collected or fixed for analysis, ~2 months later. All experiments were performed in a Biosafety level 3 security laboratory.

Results

Generation and Characterization of *Y218N* GSS Patient-Specific iPS Cells

Fibroblasts were reprogrammed at early

passages (5–7) through the retroviral delivery of *SOX2*, *KLF4*, *OCT4*, and *c-MYC* to generate up to 5 independent iPS cell lines for each individual (Fig. 1). We selected clones displaying embryonic stem cell-like morphology and positive AP staining (Fig. 1a). 5 clones representing each individual were chosen to be thoroughly characterized and shown to be fully reprogrammed, as judged by demethylation of *OCT4* and *NANOG* promoters (Fig. 1b), the silencing of the reprogramming transgenes (Fig. 1c), activation of endogenous pluripotency-associated factors (Fig. 1c), expression of pluripotency-associated transcription factors and surface markers (Fig. 1d), pluripotent differentiation ability in vitro and/or in vivo (Fig. 1f), and karyotype stability after more than 15 passages (Fig. 1e). Mutation analysis confirmed that iPS cells and their derivatives bore the mutation *Y218N* present in the patient fibroblasts (Fig. 1g).

Late Neuronal Maturation, Increased Reactive Astrogliosis and Absence of PrP Generation in *Y218N*-Derived iPS Cell Cultures Control and *Y218N*-derived iPS cells were differentiated into neural cells using two well-characterized procedures (see Methods). Neural induction was fast and efficient using both protocols (Fig. 2) and the cells sequentially expressed typical markers of neural progenitors, neuroblasts and mature neurons (Fig. 2b, f). In our first approach (Fig. 2a–d), taking into account morphology and marker expression, we established three differentiation stages: early (≈ 60 DIV), middle (≈ 60 –120 DIV) and late (≈ 120 –210 DIV) (Fig. 2a). Two weeks after neural induction, cultures were composed mainly of neural progenitors co-expressing *SOX2* and *NESTIN* with a few differentiating neuroblasts (class III β -tubulin (TUJ1)-positive). By 4 weeks many neuroblasts and young neurons expressed *PAX6* and the vast majority expressed *Doublecortin* (*DCX*) and Ubiquitin-protein ligase *E3A* (*UBE3A*) proteins (Fig. 2b). From the third month onwards, differentiating neurons expressed the mature post-mitotic neuronal marker *NeuN* (*RBFOX3*). In parallel and as also reported in vivo [41], PrP^C expression increased progressively over time during differentiation (Fig. 2c–d).

In the second protocol (Fig. 2e–h), control and *Y218N*-iPS cells were also differentiated to pure masses of neural precursors using a previously described protocol that involves the formation of EBs and the culture of neural precursor cells to form SNMs, whom can be expanded and differentiated into mature neurons after several weeks using neuronal induction medium (Fig. 2e). In these conditions, SNMs derived from control and *Y218N*-iPS cell lines homogeneously expressed neural progenitor markers such as *PAX6*, *NESTIN*, and *SOX2*, as well as the proliferation marker *Ki67* (Fig. 2f). Furthermore, when iPS cell-derived SNMs were cultured in neuronal induction medium supplemented with N2 and B27, differentiation into mature neurons was evident within 3 to 5 weeks (Fig. 2f). After about 3 weeks in neuronal medium,

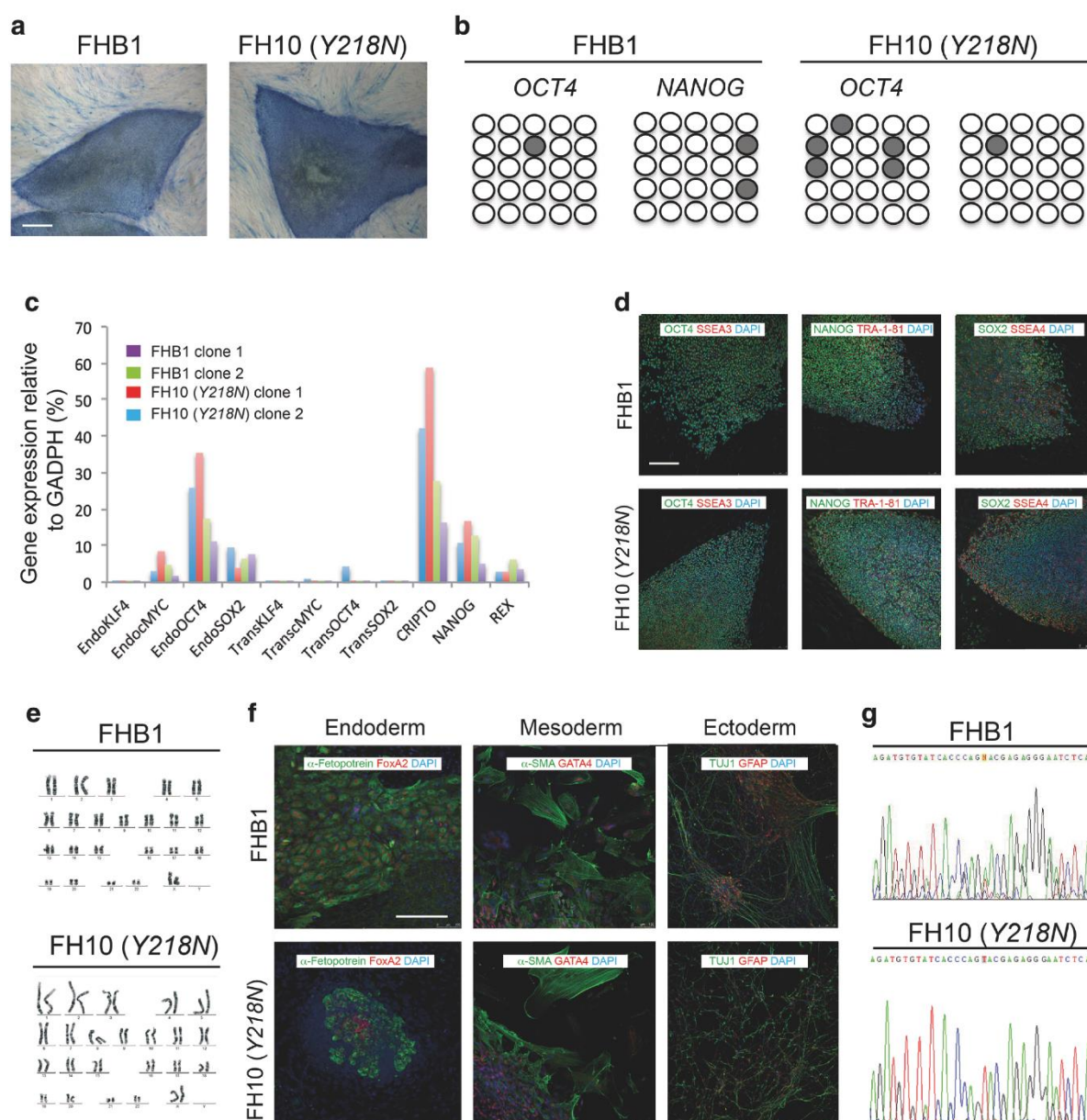


Fig. 1 Generation and characterization of iPS cells. **(a)** Control (cell line FHB1) and GSS-*Y218N*-iPS cell (cell line FH10) stained for AP activity. **(b)** Bisulphite genomic sequencing of the *OCT4* and *NANOG* promoters showing demethylation in FHB1 and FH10 (*Y218N*) cell lines. **(c)** RT-qPCR analyses of the expression levels of retroviral-derived reprogramming factors (transgenic) and endogenous expression levels (endogenous) of the indicated genes in FHB1 (two clones) and *Y218N*-iPS cells (cell line FH10, 2 clones). **(d)** Low fluorescence photomicrographs of representative colonies of FHB1 and FH10 (*Y218N*) stained positive for the pluripotency-associated markers OCT4, NANOG and

SOX2 (green), SSEA3, TRA-1-81 and SSEA4 (red). **(e)** Normal karyotypes of FHB1 and FH10 (*Y218N*) at passage 20. **(f)** Immunofluorescence analyses of FHB1 and FH10 (*Y218N*) iPS cells differentiated in vitro show the potential to generate cell derivatives of all three primary germ cell layers including ectoderm (stained for TUJ1, green), endoderm (stained for α-fetoprotein, green, and FOXA2, red) and mesoderm (stained for smooth muscle actin, SMA, red). **(g)** Direct sequence of genomic DNA from Control (cell line FHB1) and GSS patient (FH10 (*Y218N*)) identifying the *PRNP*^{*Y218N*} mutation. Scale bars in a, d and f = 50 μm

the cultures formed dense MAP2 and TUJ1-positive neuronal networks (Fig. 2f) in presence of astroglial cells (not shown). No mixed genotypes (GFAP + MAP2 or TUJ1 double labeled

cells) were observed. As observed in the first approach, PrP^C was clearly present throughout neural differentiation (Fig. 2c,g, Supplementary Fig. 1). However, no detectable

PK-resistant PrP was observed in protein extracts treated with the enzyme in the *Y218N* and control-derived neurons generated with either protocol (Fig. 2d,h), in contrast to brain extracts from *Y218N* GSS or Type 1–2 CJD patients (Fig. 2h, Supplementary Fig. 2).

We next examined the transcriptional profile of neural cultures determined by RT-qPCR from early to late culture stages (Fig. 3a) and observed significant differences between control and *Y218N* cultures, particularly at the late stage (>120 days). While there were no differences in early progenitor markers such as *NES* and *SOX2*, which showed a similar time-dependent downregulation in both genotypes, a few neuronal transcripts were lower in the *Y218N* cultures early on, like *MAP2* and *CALB*. At the late stage (>120 days), there was a robust increase in *GFAP* mRNA and a concomitant decrease in mature neuronal markers including *MAPT* and *VGLUT1* mRNAs in *Y218N* cultures compared to controls. Next, these mRNA changes were checked by immunohistochemistry and cell counts (Fig. 3b, d). Cell counts revealed that the relative percentage of DCX and GFAP expressing cells was not significantly different between control and *Y218N* cultures (data not shown). Thus, the transcriptional increase in *GFAP* expression most likely due to a greater expression in reactive astroglial cells (Fig. 3c). Indeed, detailed analysis of immunoreacted cells revealed high content of GFAP forming thick fascicles in hypertrophic reactive astroglial cells at the late stage of *Y218N* cultures (Fig. 3c). Lastly, nuclear staining analysis in differentiating cultures revealed increased chromatin condensation and apoptosis in the *Y218N* at the late stage (Fig. 3d).

Increased tau Phosphorylation in *Y218N*-Derived Neurons in Vitro

As indicated above, clinical and histopathological examination of the GSS patient carrying the *Y218N* *PRNP* mutation displayed relevant neurofibrillary degeneration with p-Tau deposits in several brain regions [17]. Therefore, we explored putative changes in Tau expression and phosphorylation in differentiating cultures (Fig. 4, Supplementary Figs. 3 and 4). As indicated above, *MAP2* and *MAPT* mRNA levels decreased in *Y218N*-derived cultures compared to controls suggesting delayed neuronal differentiation (Fig. 3). This was corroborated analyzing the appearance of the two Tau-splicing forms (4R and 3R) in differentiated cultures (Fig. 4a). RT-qPCR analysis demonstrated a delayed appearance of the 4R Tau form compared to 3R Tau in *Y218N*-derived cultures (Fig. 4a). This was corroborated by the biochemical analysis of the acetylated form of Tau at lysine 280 (K280-(ac)) Tau during the differentiation (Fig. 4b, Supplementary Fig. 4). This acetylated form is associated with Tau 4R [42, 43]. K280-(ac) Tau levels were constant in control-derived cultures from 15 to 45 DIV. However, *Y218N* cultures showed increased levels of K280-(ac) Tau between 15 to 41 DIV, following changes of Tau 4R

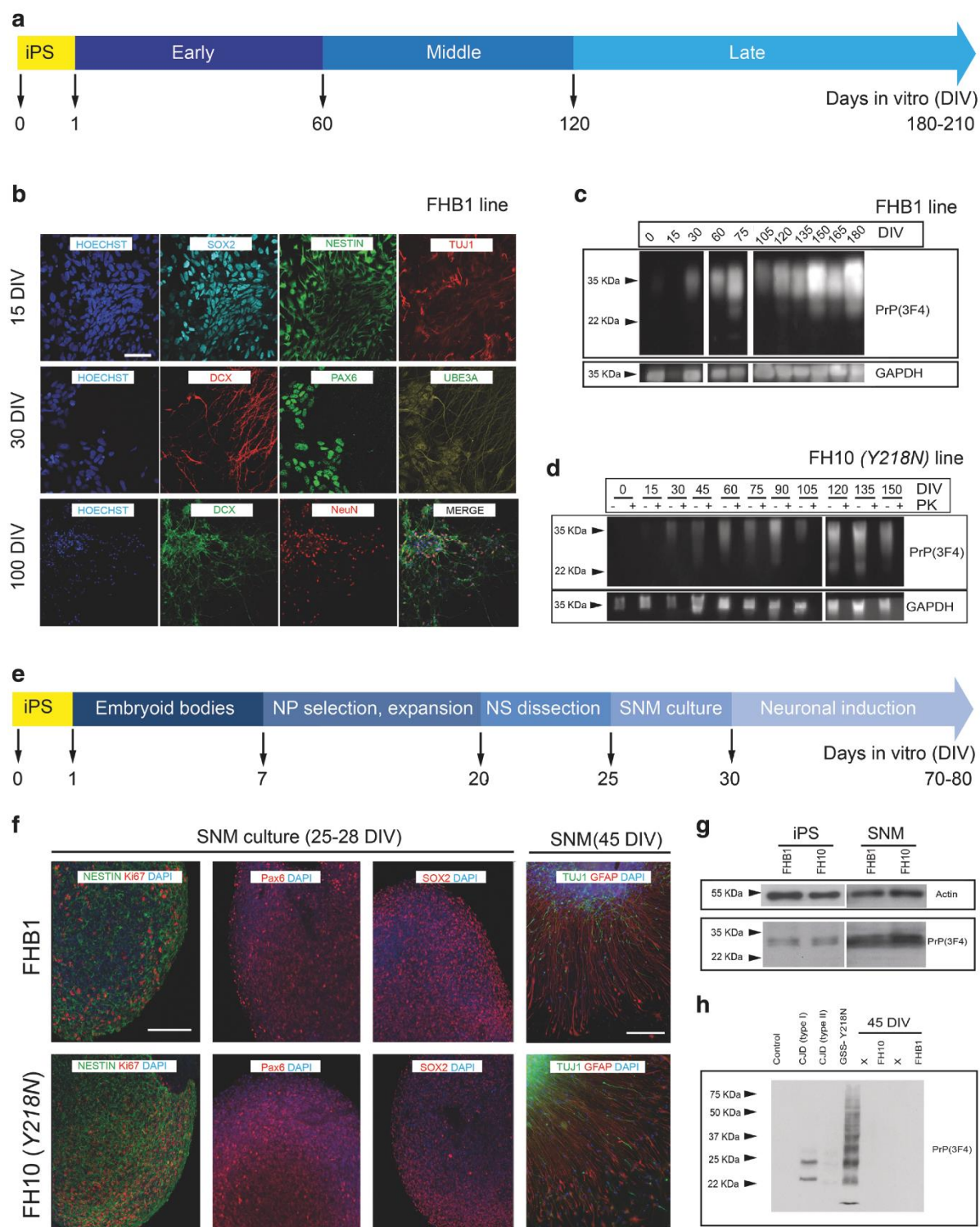
(Fig. 4b, Supplementary Fig. 4). In parallel, biochemical detection of p-Tau during differentiation demonstrated the increase in p-Tau (detected by AT8 and PHF1 antibodies) in *Y218N*-derived neurons compared to control without relevant changes in PrP^C protein levels (Fig. 4b,c, Supplementary Fig. 3).

Next, we developed a CTCF analysis of p-Tau in identified MAP2-positive neurons (Fig. 4d,e). First we counted the total number of MAP2 and p-Tau-positive neurons in *Y218N*- and control-derived cultures. As suggested above with RT-qPCR, the total number of MAP2 and p-Tau double-positive cells was lower in *Y218N*-derived cultures (Fig. 4d,e). In addition, the relative percentage of double-labeled p-Tau/MAP2 neurons was also higher in *Y218N*-derived neurons. Changes in p-Tau level in differentiated neurons were also corroborated by the CTCF analysis of p-Tau in double-labeled p-Tau/MAP2-immunoreactive neurons (Control: 1566 ± 214.4 ; *Y218N*: 4357 ± 422.1 ; mean \pm S.E.M. $P < 0.0001$, Mann-Whitney U test). Indeed, the ratio of p-Tau/MAP2 fluorescence was higher in *Y218N*-derived neurons compared to control-derived neurons (Control: 0.27 ± 0.02 ; *Y218N*: 0.680 ± 0.02 ; mean \pm S.E.M. $P < 0.0001$, Mann-Whitney $U = 2628$) (Fig. 4e,f). Unfortunately, electron microscopy analyses failed to identify neurofibrillary tangle formation in *Y218N* differentiated neurons (not shown). Similar biochemical observations were also made using the direct cortical differentiation protocol (Supplementary Fig. 5). In conclusion, cultures derived from *Y218N* mutant iPS cells recapitulated in vitro several pathological features of the GSS patient, such as reactive astrocytosis, cell death and Tau hyperphosphorylation.

Impaired Mitochondria Movement in *Y218N*-Derived Neurons

The effects of Tau hyperphosphorylation in several epitopes on mitochondria movement have been demonstrated in Alzheimer's disease [44, 28]. We checked the minimum and the mean velocity of identified mitochondria (Fig. 5). Results showed a decrease in both measurements in *Y218N* cultures compared with control (0.052 ± 0.014 (control, $n = 111$) vs 0.014 ± 0.006 (*Y218N*; $n = 105$); mean \pm S.E.M., Min. velocity in $\mu\text{m/s}$; $P = 0.0004$; Mann-Whitney U value = 4688. 0.310 ± 0.038 (control, $n = 111$) vs 0.1302 ± 0.014 (*Y218N*; $n = 105$); Mean \pm S.E.M. Mean velocity in $\mu\text{m/s}$; $P = 0.0484$; Mann-Whitney U value = 4921) (Fig. 5b).

Infectivity Assays In order to examine susceptibility to prion infection, *Y218N*- and control-differentiated cultures were exposed for 10 days to brain homogenates prepared from a sporadic CJD and from a GSS *Y218N* brain (Fig. 6a,b). Western blot analyses of the cultures showed the presence of PK-resistant PrP forms but only up to 2 weeks after removal of



the inocula, indicating lack of prion infectivity (and propagation) in these conditions (Fig. 6c). A similar signal was observed

in cultures infected with 263 K, a hamster scrapie prion strain which does not propagate to human cells (data not shown).

Fig. 2 Neural differentiation of FHB1 and FH10 (Y218N) iPS cells. iPS cells from control (FHB1) and Y218N (FH10) GSS patient were differentiated using two procedures (a and e) (see Methods for details). (b) Low power photomicrographs of representative colonies of FHB1 and FH10 (Y218N) stained positive for SOX2, Nestin, DCX, TUJ1, PAX6, UBE3A antigens at different stages of maturation. (c) Western blot characterization of PrP^C expression in differentiating iPS cell cultures. (d) Example of the Western blot experiments illustrating the absence of PK-resistant PrP^C in FH10 (Y218N) cultures. (e) Low power photomicrographs of representative colonies of FHB1 and FH10 (Y218N) stained positive for Nestin, Ki67, SOX2, TUJ1, PAX6 and GFAP antigens. (g) Western blot characterization of PrP^C expression in iPS cells (passage 20) and SNMs (passage 3). (h) Western blots illustrating the absence of PK-resistant prion in FHB1 and FH10 (Y218N) in brain extracts from the GSS patient and two CJD (Type I and II) samples. Scale bars in b and f = 50 μ m

Despite the absence of PK-resistant PrP in the cultures after two weeks, we observed some phenotypic changes that were more prominent in mutant neurons. In particular, we found a prominent redistribution of Tau signal with enhanced localization in the soma and proximal neurites in Y218N neurons exposed to either GSS or CJD inoculates was found (Fig. 6d,e).

Discussion

In the present study we have developed, for the first time, an iPS cell model of a familial human prionopathy. The donor GSS patient carrying the Y218N PRNP mutation showed relevant gliosis, cell death, massive deposits of PrP and neurofibrillary degeneration in different brain regions [17].

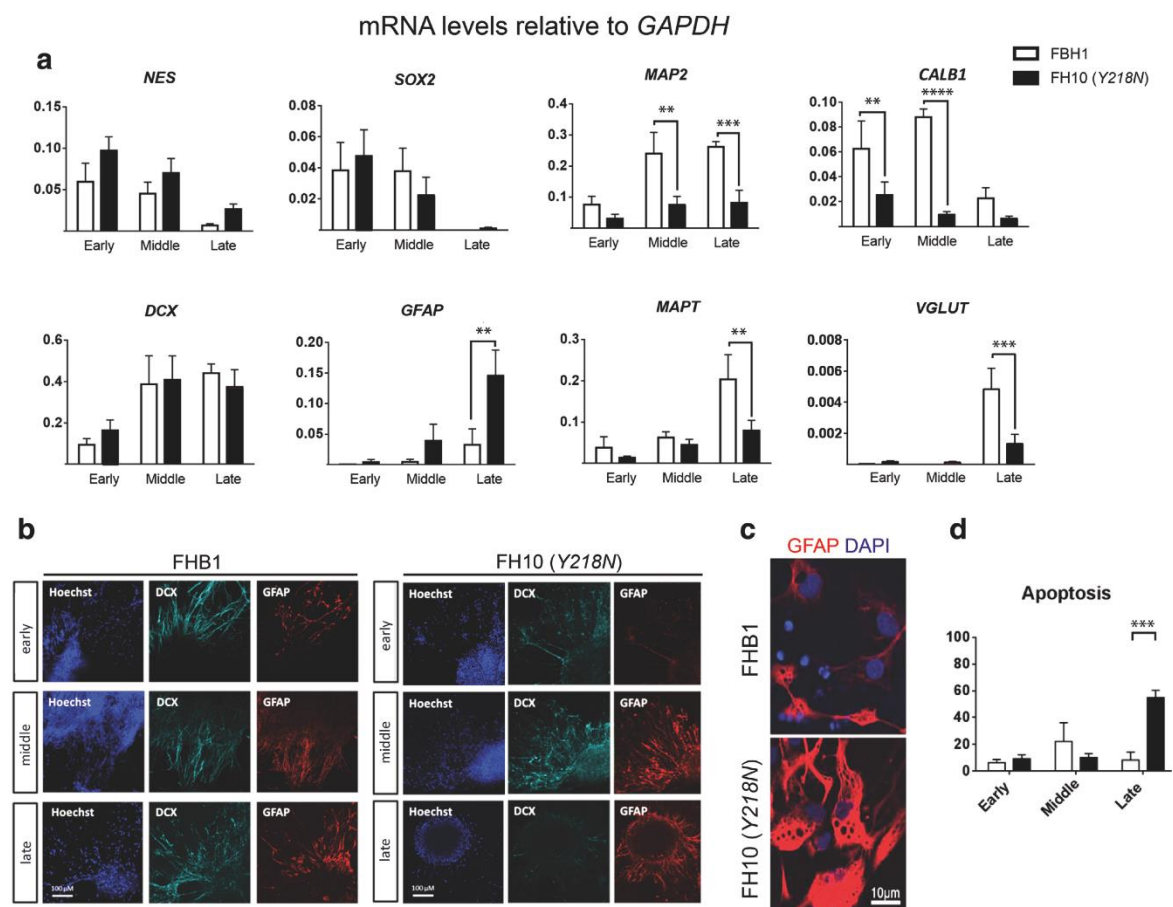


Fig. 3 Transcriptional profile of maturing iPS cell cultures. (a) Quantitative RT-PCR transcriptional profile of control and mutant cell cultures at the three maturation stages. Bars represent the mean \pm S.E.M. of 2–4 time points for each stage from at least 2 independent differentiations. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Differences between groups were considered statistically significant **** $P < 0.001$, *** $P < 0.01$ and ** $P < 0.05$. Bonferroni post

hoc test. (b) Representative immunofluorescence microphotographs of PrP^C, DCX and GFAP expression at the three differentiation stages. (c) Higher power image of GFAP positive cells at mid differentiation stage. (d) Quantification of apoptotic nuclei (% over total Hoechst). *** $P < 0.01$, Bonferroni post hoc test. Scale bars in b = 100 μ m and c = 10 μ m

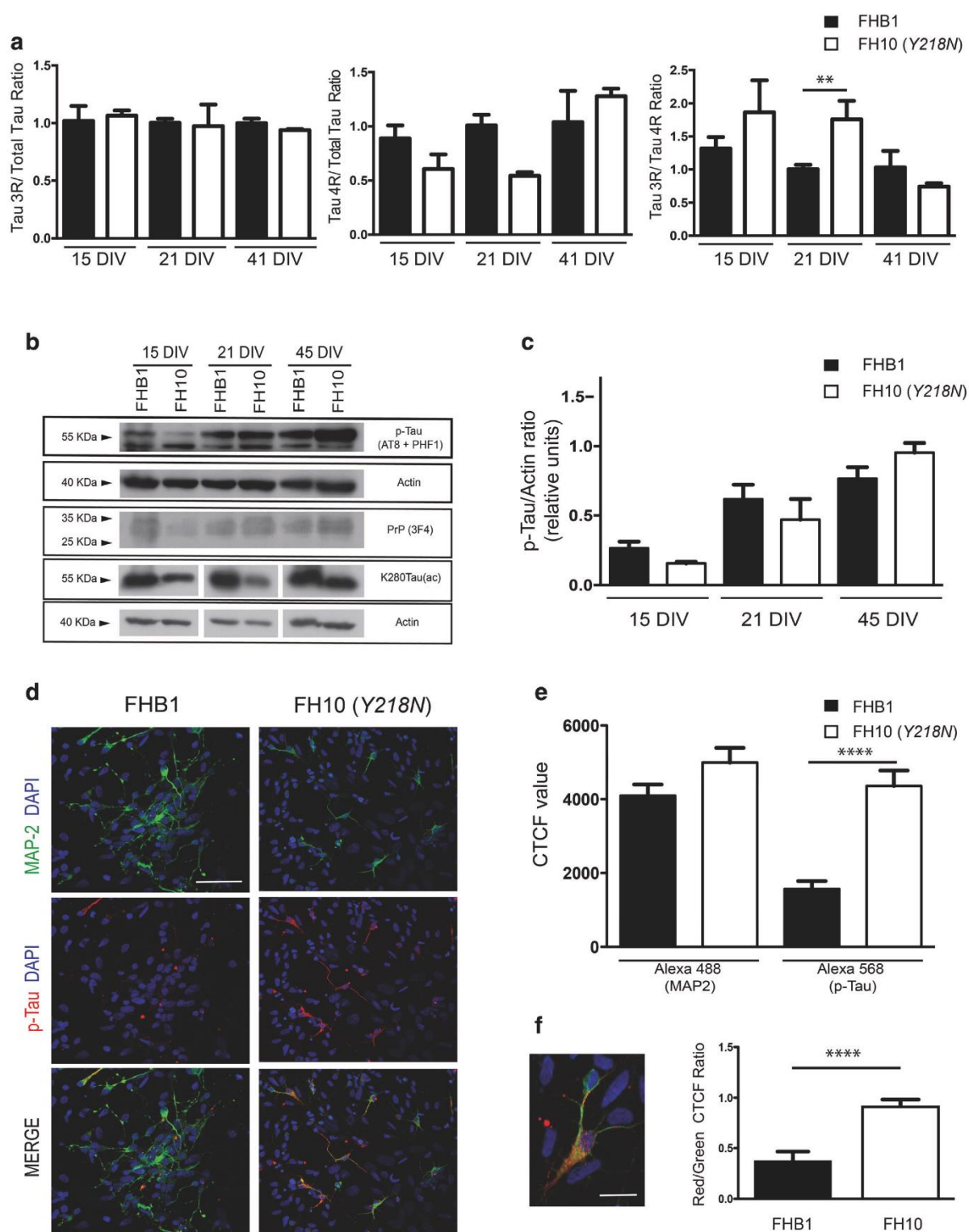


Fig. 4 Delayed MAPT maturation and increased p-Tau in Y218N-derived neurons. (a) Histograms illustrating RT-qPCR results (mean \pm S.E.M.) of Tau 3R/Total tau; Tau 4R/Total and Tau 3R/4R ratios in FHB1 and FH10 (Y218N) iPS cell cultures during differentiation at 15, 21 and 41 days in vitro. Asterisks in the right graph indicate $P < 0.05$, Bonferroni post hoc test; Mean Diff. -0.756; 95% confidence interval = -1.372 to -0.1415). (b) Time course of p-Tau, PrP^C and K280Tau-(ac) expression in FHB1 and FH10 (Y218N) at 15, 21 and 45 DIV. Actin was used as control loading protein. (c) Graph of the densitometric values of p-Tau levels of (b). Plots show mean \pm S.E.M. of three different experiments. Note the increase in p-Tau between Y218N and control cells. (d) High power photomicrographs illustrating MAP2 (green), p-Tau (red) in FHB1 and FH10 (Y218N) neural cultures. A high magnification of a labelled cell is showed in (f). (e–f) Quantification of CTCF values derived from experiments in (d). Plots show mean \pm S.E.M. of four different experiments. Asterisks in (e) indicate statistical differences between groups and controls. **** $P < 0.001$; Mann-Whitney U test. Scale bars in d = 50 μ m and f = 10 μ m

Surprisingly, the presence of the Y218N mutation in other family member belies atypical parkinsonism phenotype instead of neurofibrillary degeneration [32]. Indeed, in parallel with the classical signs of GSS-associated degeneration, other clinical presentations, such as Alzheimer's-type, frontotemporal-like dementia, parkinsonism, and atypical psychiatric disorders, have all been reported (e.g., [45]). These different clinical manifestations have also been found in family members with the same PRNP mutation, attributed to the distinct abnormal isoforms of prion protein and polymorphisms at codon 129 [46, 47]. In fact, in this case the two GSS patients differ at the codon 129 polymorphism (129MV [32] and 129VV in [17]), which may contribute to clinical differences between cases.

We used two different well-characterized procedures to differentiate the iPS cells into neurons [34, 26]. The first was directed to obtaining forebrain cortical neurons [34] and the second one was directed to maintaining regulated developmental steps during neural development [26]. With both protocols we obtained similar results being able to determine that Y218N-derived cultures showed relevant GFAP reactivity, cell death, neuronal Tau redistribution, elevated p-Tau levels and changes in mitochondrial trafficking. Despite being unable to reproduce the spontaneous generation of PK-resistant forms or enabling prion propagation after inoculation in Y218N-iPS cell derived cultures, the differentiated neural cells recapitulated most of the pathological features observed in the GSS patient's brain. In this way, these Y218N-derived cultures could be used as an in vitro platform for neurodegenerative studies in familial prionopathies with the aim of characterizing the role of particular PRNP mutations in comorbid taupathies and cell death.

Unfortunately, Y218N cells did not generate PrP spontaneously and they were unable to propagate human prions (CJD and Y218N GSS prions) in vitro. This was disappointing but certainly not fully unexpected given that it has never been

possible to propagate infectivity in primary neurons with human prions. Furthermore there are no studies of Y218N PrP propagation in vivo in contrast to other human mutations: i) P102L GSS human prion in P101L mice [48], ii) A117V GSS-derived human prion inoculum in AV117 PRNP mice [49] and iii) P102L, A117V or F198S PRNP mutations in bank voles [50].

Concerning the absence of endogenous prion generation in Y218N-derived neurons we might hypothesize, in a simplistic manner, that current in vitro times are not long enough for the endogenous generation of human PrP^{res}, considering the clinical onset and evolution of the GSS patient. However, we believe that the current scenario is not as simple, and that other, as yet unknown factors with key functions in protein misfolding and propagation may be absent from our cultures. In vitro prion propagation (of mostly mouse adapted strains) has been developed in neural and non-neural cell lines [51], primary neuronal cultures [52], cerebellar organotypic slices [53], and, with some controversy, in neurospheres (e.g., [54]). However, human prions have not been propagated in neuronal cultures to date. In fact, a single study of Ladogama et al. reported the transmission of human prions but using neuroblastoma cells [55]. In addition, the propagation of human strains was more successful when prions had been previously adapted to mice (e.g., M1000 [56]). Although endogenous expression levels could be relevant, we cannot rule out the participation of other non-neuronal cells (microglial cells) and inflammatory processes in protein misfolding and propagation [57] which did not fully develop in our iPS cell cultures, in contrast to other 3D organotypic approaches that could be assayed in future experiments [58].

In our study, the differentiation of Y218N-derived iPS cells was protracted. It is well known that appropriate temporal and transcriptional levels of PRNP are required for the correct differentiation of human embryonic stem cells [59] as well as other neural stem cells in vivo [60] and in vitro [61]. In fact, early attempts to ablate PRNP in mice using constitutive promoters and large PRNP mutations were not viable because PRNP expression starts around E7.5 in neural tissue [62]. Indeed, PrP^C is involved in several neural and non-neural developmental functions and its absence either delays or interferes with cell proliferation and maturation [63–65]. Although a clear explanation of the physiological impact of the Y218N mutation in these processes remains elusive, the mutation might induces aberrant folding of the protein [66], which may impair neuronal differentiation. In fact, in our experiments, mutant neurons showed decreased mRNA levels of CALB, VGLUT1 and MAP2 compared with control cells. In addition, Y218N-derived neurons showed very low numbers of Ca²⁺ transients analyzed by Fluo4-AM (data not shown).

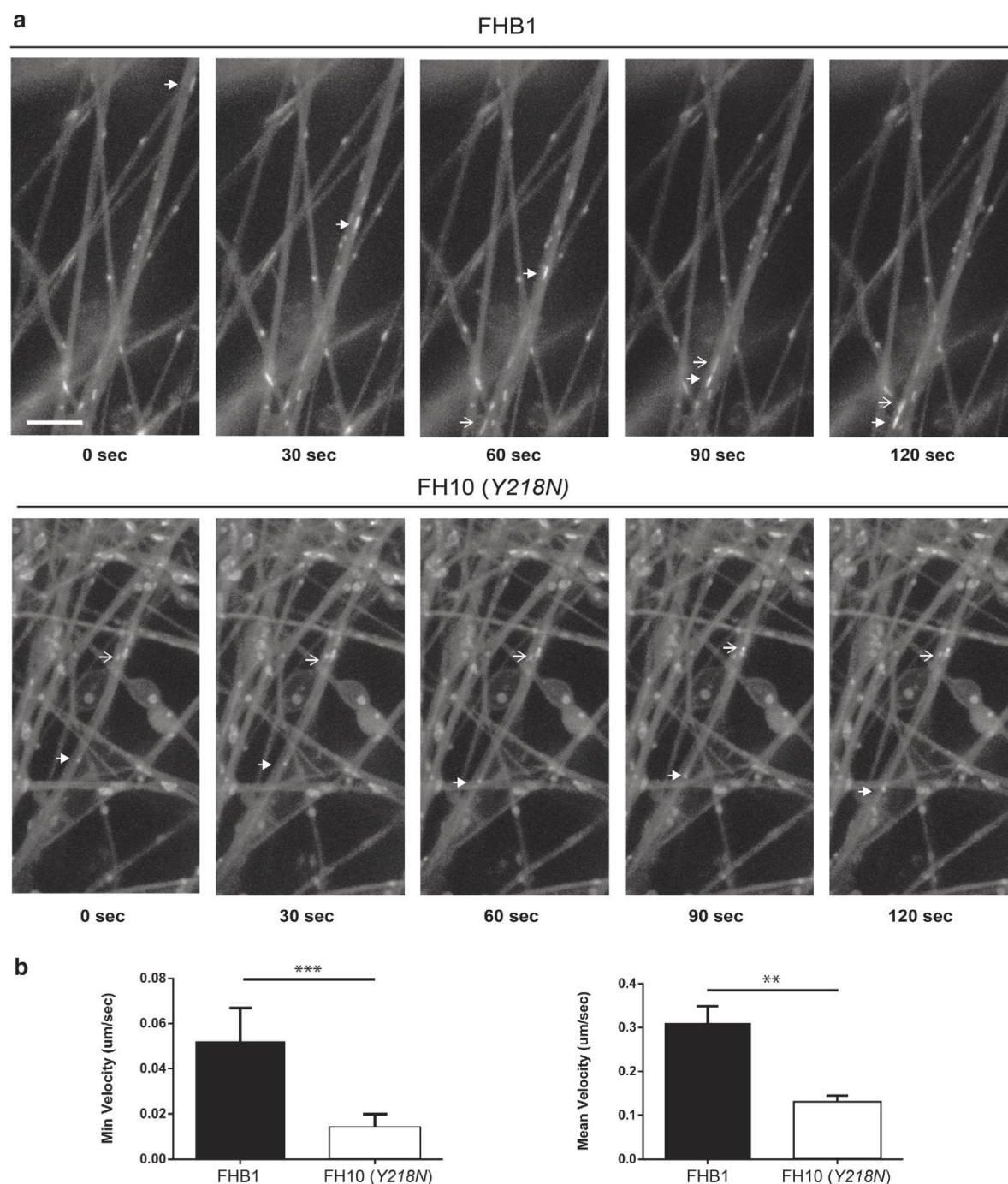


Fig. 5 FH10 (Y218N) cultures showed impaired mitochondria displacement. (a) Time-lapse fluorescence photomicrographs illustrating mitochondria movement in FHB1- (upper panels) and FH10 (Y218N)- (lower panels) derived neurons. The movement of two mitochondria (arrow and open arrow in (a)) can be seen in the time lapse panels. (b) Plots

illustrating the Minimum and Mean velocity values of tracked mitochondria in both types of cultures (see Methods for details). Notice the strong decreases in velocity in FH10 (Y218N)-derived cultures. Plots show mean \pm S.E.M. of three different differentiation experiments. *** $P < 0.01$, ** $P < 0.05$. Mann Whitney U test. Scale bar: a = 2.5 μ m

The deposition of hyperphosphorylated forms of Tau (p-Tau) has been described in familial and sporadic forms of prion

diseases and in the brains of patients with variant CJD. Elevated levels of Tau (p-Tau and total Tau) have also been

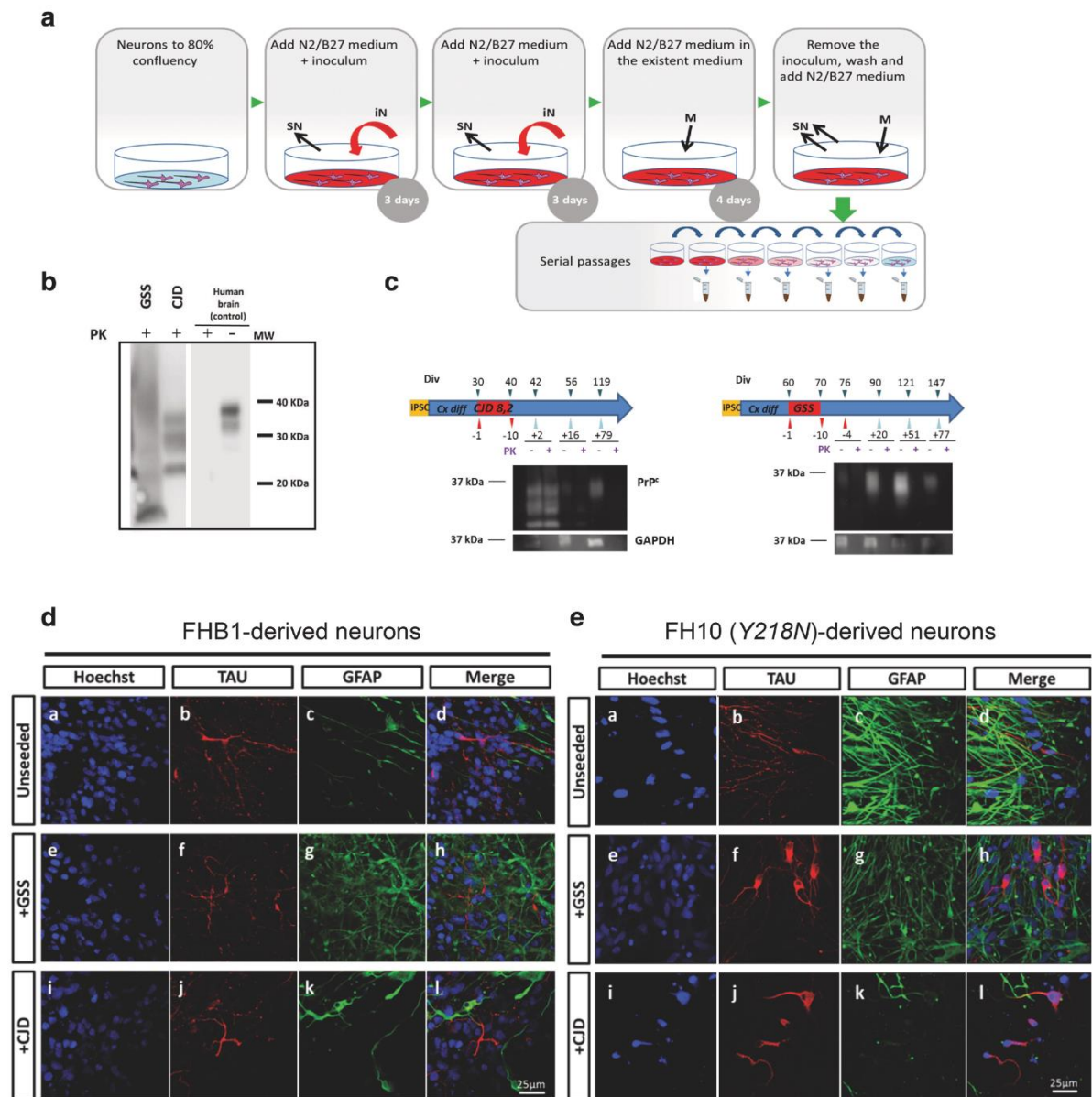


Fig. 6 Infectivity assay with brain inoculates. (a) Schematic representation of the inoculation protocol: infective brain homogenates were added at day 0 and day 3 and removed at day 10; cells were subsequently passaged several times to remove the inocula. (b) Inocula from the sources (10% of brain homogenates, see Methods for details) were processed to show PK-resistant PrP signal. GSS: human brain diagnosed of *Y218N*. CJD: human brain diagnosed of a sporadic CJD MM1. CJD samples were digested with 10–50 µg/ml of proteinase K (PK) and subjected to a standard biochemical analysis. GSS sample was treated as

an atypical prion sample (see Methods). The samples were analyzed using the monoclonal antibody 3F4. MW: Molecular marker. (c) Representative examples of Western blot detection of PK-resistant PrP forms following inoculation with CJD and GSS brain samples. Note that PK-resistant PrP was only detected (when present) for the first 2 weeks after the infection. (d) Morphological analyses 2 months later revealed little effect of these inoculates in control neurons while mutant *Y218N* cultures (e) showed fewer neurons with marked cytoplasmic redistribution of Tau signal (b, f, j) and enhanced immunoreactivity for GFAP. Scale bars: 25 µm

reported in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with sporadic CJD [67]. In addition, rodents infected with BSE [68], 263 K [69] and human CJD [70] derived inocula also showed elevated levels of p-Tau. Indeed, neurons in encephalopathy-

affected brain regions displaying PrP aggregates showed relevant Tau redistribution with increased perinuclear location. This perinuclear Tau reorganization was observed in CJD- and GSS-treated *Y218N*-derived neurons in this study. In this matter, it is

well known that aggregated prion peptides [71], as well as infectious prions [70], may modulate microtubule dynamics and stability, which may also in turn implicate Tau distribution. The increased presence and neuronal redistribution of Tau likely has a direct effect on the neuropathological process triggered by prion presence, because PrP^C binding to Tau is probably disrupted by the mutations (at least for P102L *PRNP* [18]). In fact, if we consider that Y218N might alter natural PrP^C functions associated with Tau, the cellular responses mediated by sCJD and GSS prions might be exacerbated in the presence of the Y218N *PRNP* mutation.

In conclusion, we report here the use of iPS cell-derived neurons to investigate the putative roles of the Y218N *PRNP* mutation in neural differentiation, Tau phosphorylation and cell death. This approach provides a powerful in vitro system for functional analysis of pathways regulating *PRNP* function in human cortical neurons, cellular mechanisms regulating tau phosphorylation in these models and for the identification and testing of candidate disease-modifying compounds.

Acknowledgements The authors thank Tom Yohannan for editorial advice and M. Segura-Feliu for technical assistance. We thank members of the Del Río, Sánchez-Pernaute, Castilla, Raya, Consiglio, López de Munain and Ferrer groups for stimulating discussions and ideas. We also thank to Lidia Bardia of the Advanced Confocal Microscopy service of the IRB-PCB for helping us with mitochondria tracking experiments. This research was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO) (BFU2015-67777-R), the Spanish prion network (Prionet Spain, AGL2015-71764-REDT), the Generalitat de Catalunya (SGR2014-1218), CIBERNED (PI2014/02-4 (Rapid dementias) and PI2016/02 (MFDEND)), La Caixa Obra Social Foundation, La Marató de TV3 to J.A.D.R.. R.S.P. was funded by the Joint Program in Neurodegenerative Diseases (DAMNDPATHS, AC14/00021). J.C. was funded by MINECO (AGL2015-65046-C2-1-R) and EITB Maratóia (BioEF): BIO12/AL/004. A.R. was supported by MINECO (SAF2015-69706-R), Instituto de Salud Carlos III/FEDER (TerCel RD16/0011/0024, PIE14/00061), AGAUR (2014-SGR-1460), and Fundació La Marató de TV3 (201534-30) and CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. I.F. was funded was supported by grants from CIBERNED (PI2014/02-4 Rapid dementias) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (Instituto de Salud Carlos III), and co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF) – a way to build Europe PIE14/00034 and PI14/00757. A.C. was also supported by BFU2013-49157-P and RETICTerCel grants from MINECO and the European Research Council (ERC) 2012-StG (311736-PD-HUMMODEL). A.L.M. was funded by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (Instituto de Salud Carlos III (PI14/00436)), and the Joint Program in Neurodegenerative Diseases (DEMTEST). A.M-A. was supported by a fellowship from the Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno. L.M.G. was supported by a CONACYT fellowship (CVU 357631, Mexico). The authors declare no conflicts of interest.

Author Contribution A.M-A.; L.M.G.; Y.R-P. performed most of the experiments. Y.R-P.; A.D.D.; A.C.; A.R. generated the iPS cell lines and developed the second protocol of neuronal differentiation and their characterization with C.V.; R.G.; A.H.; I.F. and A.M-A.; A.S. L.M.G and R. S-P. developed the first protocol of iPS differentiation and their characterization with RL-M. L.M.G and N.F.B performed the infectivity assays and the analysis of results with J.C. and R. S-P. A.L.M.; A.R.; J.C.; R.S-

P.; J.A.D.R. designed and supervised the experiments and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

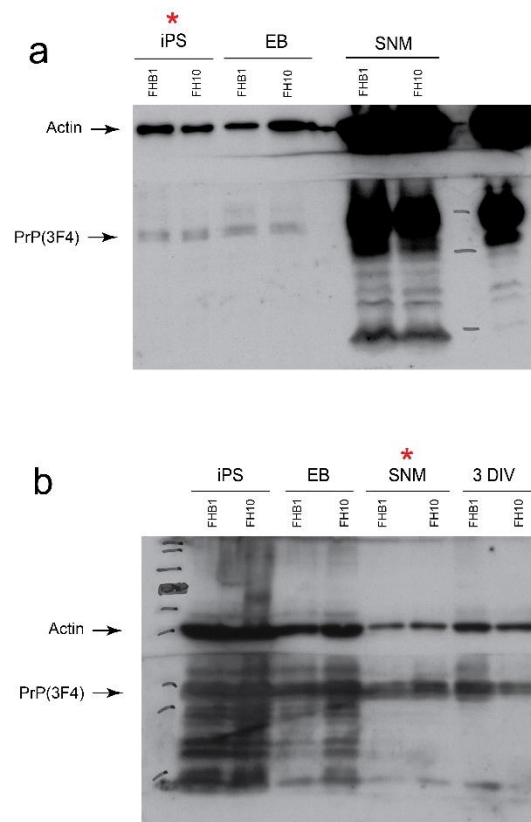
References

1. Ironside JW (1998) Prion diseases in man. *J Pathol* 186(3):227–234. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(1998110)186:3<227::AID-PATH174>3.0.CO;2-3
2. Schmidt C, Haik S, Satoh K, Rabano A, Martinez-Martin P, Roeber S, Brandel JP, Calero-Lara M et al (2012) Rapidly progressive Alzheimer's disease: A multicenter update. *J Alzheimers Dis* 30(4):751–756. doi:10.3233/JAD-2012-120007
3. Hodges JR, Davies R, Xuereb J, Kril J, Halliday G (2003) Survival in frontotemporal dementia. *Neurology* 61(3):349–354
4. Roberson ED, Hesse JH, Rose KD, Slama H, Johnson JK, Yaffe K, Forman MS, Miller CA et al (2005) Frontotemporal dementia progresses to death faster than Alzheimer disease. *Neurology* 65(5):719–725. doi:10.1212/01.wnl.0000173837.82820.9f
5. Greenfield JG, Graham DI, Lantos PL (2002) Greenfield's neuropathology, 7th edn. Arnold, London, New York
6. Liberski PP, Ironside JW (2004) An outline of the neuropathology of transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases). *Folia Neuropathol* 42(Suppl B):39–58
7. Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Nokura K, Tatsumi S, Mimuro M, Kitamoto T, Yoshida M (2014) Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with P102L prion protein gene mutation presenting with rapidly progressive clinical course. *Clin Neuropathol* 33(5):344–353. doi:10.5414/NP300733
8. Collins S, McLean CA, Masters CL (2001) Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: A review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *J Clin Neurosci* 8(5):387–397. doi:10.1054/jocn.2001.0919
9. Piccardo P, Seiler C, Dlouhy SR, Young K, Farlow MR, Prelli F, Frangione B, Bugiani O et al (1996) Proteinase-K-resistant prion protein isoforms in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (Indiana kindred). *J Neuropathol Exp Neurol* 55(11):1157–1163
10. Ishizawa K, Komori T, Shimazu T, Yamamoto T, Kitamoto T, Shimazu K, Hirose T (2002) Hyperphosphorylated tau deposition parallels prion protein burden in a case of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome P102L mutation complicated with dementia. *Acta Neuropathol* 104(4):342–350. doi:10.1007/s00401-002-0547-3
11. Yamazaki M, Oyanagi K, Mori O, Kitamura S, Ohya M, Terashi A, Kitamoto T, Katayama Y (1999) Variant Gerstmann-Straussler syndrome with the P105L prion gene mutation: An unusual case with nigral degeneration and widespread neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol* 98(5):506–511
12. Tranchant C, Sergeant N, Wattez A, Mohr M, Warter JM, Delacourte A (1997) Neurofibrillary tangles in Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome with the A117V prion gene mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63(2):240–246
13. Simpson M, Johansen V, Boyd A, Klug G, Masters CL, Li QX, Pamphlett R, McLean C et al (2013) Unusual clinical and molecular-pathological profile of gerstmann-Straussler-Scheinker disease associated with a novel PRNP mutation (V176G). *JAMA Neurol* 70(9):1180–1185. doi:10.1001/jamaneurol.2013.165

14. Ghetti B, Tagliavini F, Giaccone G, Bugiani O, Frangione B, Farlow MR, Dlouhy SR (1994) Familial Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Mol Neurobiol* 8(1):41–48. doi:10.1007/BF02778006
15. Hsiao K, Dlouhy SR, Farlow MR, Cass C, Da Costa M, Conneally PM, Hodes ME, Ghetti B et al (1992) Mutant prion proteins in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nat Genet* 1(1):68–71. doi:10.1038/ng0492-68
16. Woulfe J, Kertesz A, Frohn I, Bauer S, George-Hyslop PS, Bergeron C (2005) Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with the Q217R mutation mimicking frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol* 110(3):317–319. doi:10.1007/s00401-005-1054-0
17. Alzualde A, Indakotexa B, Ferrer I, Moreno F, Barandiaran M, Gorostidi A, Estanga A, Ruiz I et al (2010) A novel PRNP Y218N mutation in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 69(8):789–800. doi:10.1097/NEN.0b013e3181e85737
18. Wang XF, Dong CF, Zhang J, Wan YZ, Li F, Huang YX, Han L, Shan B et al (2008) Human tau protein forms complex with PrP and some GSS- and fCJD-related PrP mutants possess stronger binding activities with tau in vitro. *Mol Cell Biochem* 310(1–2):49–55. doi:10.1007/s11010-007-9664-6
19. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
20. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2(12):3081–3089. doi:10.1038/nprot.2007.418
21. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S (2017) Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* 16(2):115–130. doi:10.1038/nrd.2016.245
22. Rao M (2013) iPSC crowdsourcing: A model for obtaining large panels of stem cell lines for screening. *Cell Stem Cell* 13(4):389–391. doi:10.1016/j.stem.2013.09.005
23. Dolmetsch R, Geschwind DH (2011) The human brain in a dish: The promise of iPSC-derived neurons. *Cell* 145(6):831–834. doi:10.1016/j.cell.2011.05.034
24. Muratore CR, Rice HC, Srikanth P, Callahan DG, Shin T, Benjamin LN, Walsh DM, Selkoe DJ et al (2014) The familial Alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and tau expression in iPSC-derived neurons. *Hum Mol Genet* 23(13):3523–3536. doi:10.1093/hmg/ddu064
25. Schondorf DC, Aureli M, McAllister FE, Hindley CJ, Mayer F, Schmid B, Sardi SP, Valsecchi M et al (2014) iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nat Commun* 5:4028. doi:10.1038/ncomms5028
26. Sanchez-Danes A, Richaud-Patin Y, Carballo-Carbajal I, Jimenez-Delgado S, Caig C, Mora S, Di Guglielmo C, Ezquerro M et al (2012) Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol Med* 4(5):380–395. doi:10.1002/emmm.201200215
27. Jeon I, Lee N, Li JY, Park IH, Park KS, Moon J, Shim SH, Choi C et al (2012) Neuronal properties, in vivo effects, and pathology of a Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 30(9):2054–2062. doi:10.1002/stem.1135
28. Iovino M, Agathou S, Gonzalez-Rueda A, Del Castillo V-HM, Borroni B, Alberici A, Lynch T, O'Dowd S et al (2015) Early maturation and distinct tau pathology in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with MAPT mutations. *Brain* 138(Pt 11):3345–3359. doi:10.1093/brain/awv222
29. Zhang K, Donnelly CJ, Haeusler AR, Grima JC, Machamer JB, Steinwald P, Daley EL, Miller SJ et al (2015) The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature* 525(7567):56–61. doi:10.1038/nature14973
30. Zhang Y, Pak C, Han Y, Ahlenius H, Zhang Z, Chanda S, Marro S, Patzke C et al (2013) Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron* 78(5):785–798. doi:10.1016/j.neuron.2013.05.029
31. Canals I, Soriano J, Orlandi JG, Torrent R, Richaud-Patin Y, Jimenez-Delgado S, Merlin S, Follenzi A et al (2015) Activity and high-order effective connectivity alterations in Sanfilippo C patient-specific neuronal networks. *Stem Cell Reports* 5(4):546–557. doi:10.1016/j.stemcr.2015.08.016
32. Ribosa-Nogue R, Pagonabarraga J, Gomez-Anson B, Granell-Moreno E, Sanchez-Valle R, Kulisevsky J (2015) Gerstmann-Straussler-Scheinker Disease Presenting with Atypical Parkinsonism, but Typical Magnetic Resonance Imaging Findings of Prion Disease. *Movement Disorders*:93–95.
33. Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castella M et al (2009) Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460(7251):53–59. doi:10.1038/nature08129
34. Espuny-Camacho I, Michelsen KA, Gall D, Linaro D, Hasche A, Bonnefont J, Bali C, Orduz D et al (2013) Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits in vivo. *Neuron* 77(3):440–456. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.011
35. Gaspard N, Bouschet T, Herpoel A, Nacije G, van den Amele J, Vanderhaeghen P (2009) Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc* 4(10):1454–1463. doi:10.1038/nprot.2009.157
36. Aguila JC, Blak A, van Arensbergen J, Sousa A, Vazquez N, Aduriz A, Gayosso M, Lopez Mato MP et al (2014) Selection based on FOXA2 expression is not sufficient to enrich for dopamine neurons from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 3(9):1032–1042. doi:10.5966/sctm.2014-0011
37. Cho MS, Hwang DY, Kim DW (2008) Efficient derivation of functional dopaminergic neurons from human embryonic stem cells on a large scale. *Nat Protoc* 3(12):1888–1894. doi:10.1038/nprot.2008.188
38. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A (2014) Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* 13(9):1400–1412. doi:10.4161/cc.28401
39. Oelschlegel AM, Geissen M, Lenk M, Riebe R, Angermann M, Schatzl H, Groschup MH (2015) A bovine cell line that can be infected by natural sheep scrapie prions. *PLoS One* 10(1):e0117154. doi:10.1371/journal.pone.0117154
40. Pirisinu L, Nonno R, Esposito E, Benestad SL, Gambetti P, Agrimi U, Zou WQ (2013) Small ruminant nor98 prions share biochemical features with human gerstmann-straussler-scheinker disease and variably protease-sensitive prionopathy. *PLoS One* 8(6):e66405. doi:10.1371/journal.pone.0066405
41. Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR et al (1992) Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 42(1):149–156
42. Grinberg LT, Wang X, Wang C, Sohn PD, Theofilas P, Sidhu M, Arevalo JB, Heinsen H et al (2013) Argrophilic grain disease differs from other tauopathies by lacking tau acetylation. *Acta Neuropathol* 125(4):581–593. doi:10.1007/s00401-013-1080-2
43. Cohen TJ, Guo JL, Hurtado DE, Kwong LK, Mills IP, Trojanowski JQ, Lee VM (2011) The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat Commun* 2:252. doi:10.1038/ncomms1255
44. Shahpasand K, Uemura I, Saito T, Asano T, Hata K, Shibata K, Toyoshima Y, Hasegawa M et al (2012) Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *J*

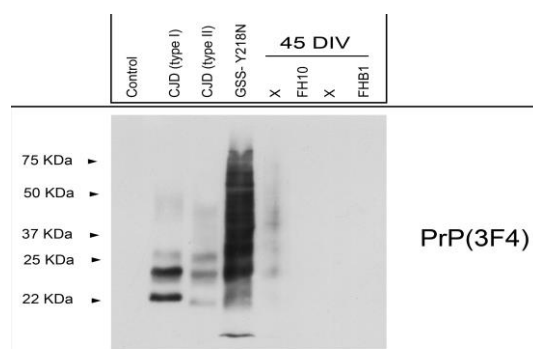
- Neurosci 32(7):2430–2441. doi:10.1523/JNEUROSCI.5927-11.2012
45. Webb TE, Poulter M, Beck J, Uphill J, Adamson G, Campbell T, Linehan J, Powell C et al (2008) Phenotypic heterogeneity and genetic modification of P102L inherited prion disease in an international series. *Brain* 131(Pt 10):2632–2646. doi:10.1093/brain/awn202
 46. Furukawa H, Doh-ura K, Kikuchi H, Tateishi J, Iwaki T (1998) A comparative study of abnormal prion protein isoforms between Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome and Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci* 158(1):71–75
 47. Parchi P, Chen SG, Brown P, Zou W, Capellari S, Budka H, Hainfellner J, Reyes PF et al (1998) Different patterns of truncated prion protein fragments correlate with distinct phenotypes in P102L Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14):8322–8327
 48. Asante EA, Grimshaw A, Smidak M, Jakubcova T, Tomlinson A, Jeelani A, Hamdan S, Powell C et al (2015) Transmission properties of human PrP 102L prions challenge the relevance of mouse models of GSS. *PLoS Pathog* 11(7):e1004953. doi:10.1371/journal.ppat.1004953
 49. Asante EA, Linehan JM, Smidak M, Tomlinson A, Grimshaw A, Jeelani A, Jakubcova T, Hamdan S et al (2013) Inherited prion disease A117V is not simply a proteinopathy but produces prions transmissible to transgenic mice expressing homologous prion protein. *PLoS Pathog* 9(9):e1003643. doi:10.1371/journal.ppat.1003643
 50. Pirisinu L, Di Bari MA, D'Agostino C, Marcon S, Riccardi G, Poleggi A, Cohen ML, Appleby BS et al (2016) Gerstmann-Straussler-Scheinker disease subtypes efficiently transmit in bank voles as genuine prion diseases. *Scientific reports* 6:20443. doi:10.1038/srep20443
 51. Kohn PC, Stoltze L, Flechsig E, Enari M, Weissmann C (2003) A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(20):11666–11671. doi:10.1073/pnas.1834432100
 52. Cronier S, Laude H, Peyrin JM (2004) Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(33):12271–12276. doi:10.1073/pnas.0402725101
 53. Falsig J, Aguzzi A (2008) The prion organotypic slice culture assay—POSCA. *Nat Protoc* 3(4):555–562. doi:10.1038/nprot.2008.13
 54. Giri RK, Young R, Pitstick R, DeArmond SJ, Prusiner SB, Carlson GA (2006) Prion infection of mouse neurospheres. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10):3875–3880. doi:10.1073/pnas.0510902103
 55. Ladogana A, Liu Q, Xi YG, Pocchiari M (1995) Proteinase-resistant protein in human neuroblastoma cells infected with brain material from Creutzfeldt-Jakob patient. *Lancet* 345(8949):594–595
 56. Lewis V, Hill AF, Haigh CL, Klug GM, Masters CL, Lawson VA, Collins SJ (2009) Increased proportions of C1 truncated prion protein protect against cellular M1000 prion infection. *J Neuropathol Exp Neurol* 68(10):1125–1135. doi:10.1097/NEN.0b013e3181b96981
 57. Heikenwalder M, Zeller N, Seeger H, Prinz M, Kohn PC, Schwarz P, Ruddle NH, Weissmann C et al (2005) Chronic lymphocytic inflammation specifies the organ tropism of prions. *Science* 307(5712):1107–1110. doi:10.1126/science.1106460
 58. Falsig J, Julius C, Margalith I, Schwarz P, Heppner FL, Aguzzi A (2008) A versatile prion replication assay in organotypic brain slices. *Nat Neurosci* 11(1):109–117. doi:10.1038/nn2028
 59. Lee YJ, Baskakov IV (2014) The cellular form of the prion protein guides the differentiation of human embryonic stem cells into neuron-, oligodendrocyte-, and astrocyte-committed lineages. *Prion* 8(3):266–275. doi:10.4161/pri.32079
 60. Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, Macklis JD (2006) Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(9):3416–3421. doi:10.1073/pnas.0511290103
 61. Santos TG, Silva IR, Costa-Silva B, Lepique AP, Martins VR, Lopes MH (2011) Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein. *Stem Cells* 29(7):1126–1136. doi:10.1002/stem.664
 62. Tremblay P, Bouzamondo-Bernstein E, Heinrich C, Prusiner SB, DeArmond SJ (2007) Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain Res* 1139:60–67. doi:10.1016/j.brainres.2006.12.055
 63. Del Rio JA, Gavin R (2016) Functions of the cellular prion protein, the end of Moore's law, and Ockham's razor theory. *Prion* 10(1):25–40. doi:10.1080/19336896.2015.1126038
 64. Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88(2):673–728. doi:10.1152/physrev.00007.2007
 65. Llorens F, Carulla P, Villa A, Torres JM, Fortes P, Ferrer I, del Rio JA (2013) PrP(C) regulates epidermal growth factor receptor function and cell shape dynamics in Neuro2a cells. *J Neurochem* 127(1):124–138. doi:10.1111/jnc.12283
 66. Cheng CJ, Daggett V (2014) Different misfolding mechanisms converge on common conformational changes: Human prion protein pathogenic mutants Y218N and E196K. *Prion* 8(1):125–135
 67. Otto M, Wiltfang J, Tümani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J, Weber T, Kretzschmar HA et al (1997) Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 225(3):210–212
 68. Bautista MJ, Gutierrez J, Salguero FJ, Fernandez de Marco MM, Romero-Trevello JL, Gomez-Villamandos JC (2006) BSE infection in bovine PrP transgenic mice leads to hyperphosphorylation of tau-protein. *Vet Microbiol* 115(4):293–301. doi:10.1016/j.vetmic.2006.02.017
 69. Wang GR, Shi S, Gao C, Zhang BY, Tian C, Dong CF, Zhou RM, Li XL et al (2010) Changes of tau profiles in brains of the hamsters infected with scrapie strains 263 K or 139 a possibly associated with the alteration of phosphate kinases. *BMC Infect Dis* 10:86. doi:10.1186/1471-2334-10-86
 70. Lawson VA, Klemm HM, Welton JM, Masters CL, Crouch P, Cappai R, Ciccotosto GD (2011) Gene knockout of tau expression does not contribute to the pathogenesis of prion disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 70(11):1036–1045. doi:10.1097/NEN.0b013e318235b471
 71. Brown DR (2000) Altered toxicity of the prion protein peptide PrP106-126 carrying the ala(117)→Val mutation. *Biochem J* 346(Pt 3):785–791

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

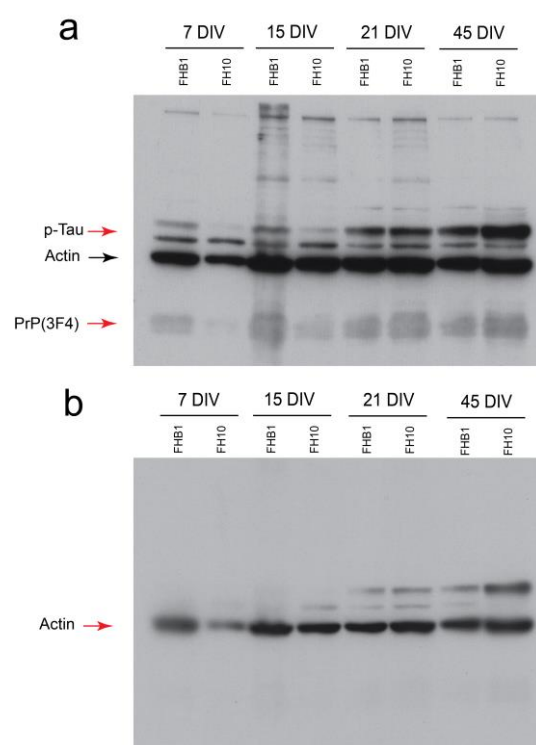


Supplementary Figure 1: Full size uncropped blots corresponding to Fig. 2g. IPS (asterisk in a) and SNM (asterisk in b).

SUPPLEMENTARY FIGURE 2

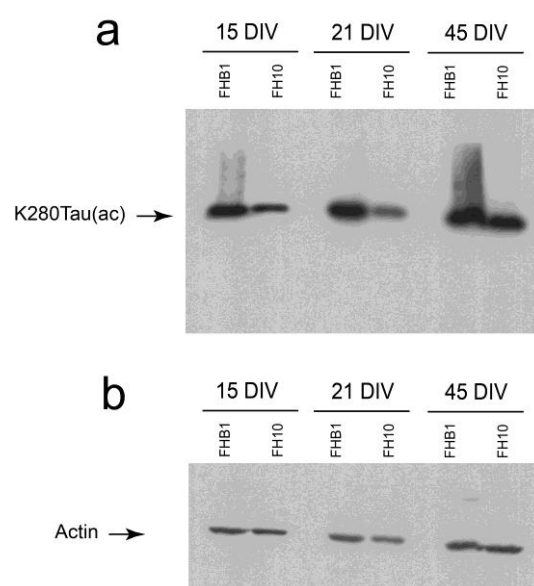


Supplementary Figure 2: High ECL exposure (15 min) showing the determination of PK-resistant PrP^C levels illustrated in Fig. 2h. Uncropped film.

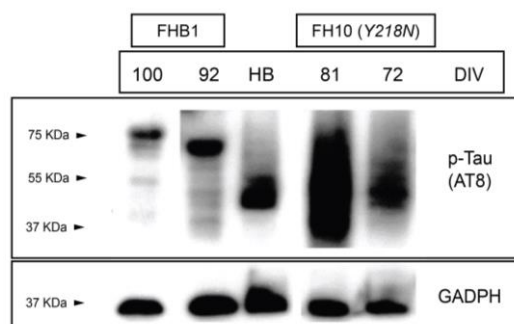
SUPPLEMENTARY FIGURE 3

Supplementary Figure 3: Full size uncropped blots corresponding to Fig. Fig.4b4b (upper panels). Red arrows point to the proteins of interest. Data from 15, 21 and 45 DIV are shown in Fig. 4b.

SUPPLEMENTARY FIGURE 4



Supplementary Figure 4: Full size uncropped blots corresponding to Fig.4b (lower panels).

SUPPLEMENTARY FIGURE 5

Supplementary Figure 5: Determination of p-Tau (AT8 antibody) levels in FHB1 and FH10 (Y218N)-derived cultures at several DIV of differentiation (procedure 1, see Methods). p-Tau probed membranes were immunoblotted using antibodies against GADPH for standardization.

SUPPLEMENTARY TABLE 1

Test	Gene	Primer
qPCR	Total OCT4 Forward	5'-GGAGGAAGCTGACAACAATGAAA-3'
qPCR	Total OCT4 Reverse	5'-GGCCTGCACGAGGGTTT-3'
qPCR	Total SOX2 Forward	5'-TGCGAGCGCTGCACAT-3'
qPCR	Total SOX2 Reverse	5'-TCATGAGCGTCTTGTTTTCC-3'
qPCR	Total KLF4 Forward	5'-CGAACCCACACAGGTGAGAA-3'
qPCR	Total KLF4 Reverse	5'-GAGCGGGCGAATTTCAT-3'
qPCR	Total c-MYC Forward	5'-AGGGTCAAGTTGGACAGTGTCA-3'
qPCR	Total c-MYC Reverse	5'-TGGTGCATTTTCGGTTGTG-3'
qPCR	Trans OCT4 Forward	5'-TGGACTACAAGGACGACGATGA-3'
qPCR	Trans OCT4 Reverse	5'-CAGGTGTCCCGCCATGA-3'
qPCR	Trans SOX2 Forward	5'-GCTCGAGGTTAACGAATTCATGT-3'
qPCR	Trans SOX2 Reverse	5'-GCCCGGCGGCTTCA-3'
qPCR	Trans KLF4 Forward	5'-TGGACTACAAGGACGACGATGA-3'
qPCR	Trans KLF4 Reverse	5'-CGTCGCTGACAGCCATGA-3'
qPCR	Trans c-MYC Forward	5'-TGGACTACAAGGACGACGATGA-3'
qPCR	Trans c-MYC Reverse	5'-GTTCTGTGTTGTTGAAGCTAACGT-3'
qPCR	NANOG Forward	5'-ACAACTGGCCGAAGAATAGCA-3'
qPCR	NANOG Reverse	5'-GGTCCCAGTCGGGTTTAC-3'
qPCR	CRIPTO Forward	5'-CGGAACTGTGAGCACGATGT-3'
qPCR	CRIPTO Reverse	5'-GGGCAGCCAGGTGTCATG-3'
qPCR	REX1 Forward	5'-CCTGCAGGCGGAAATAGAAC-3'
qPCR	REX1 Reverse	5'-GCACACATAGCCATCACATAAGG-3'
qPCR	GAPDH Forward	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
qPCR	GAPDH Reverse	5'-AGGGATCTCGCTCCTGGAA-3'
Bisulfite seq	OCT4 Forward	5'-GGATGTTATTAAGATGAAGATAGTTGG-3'
Bisulfite seq	OCT4 Reverse	5'-CCTAAACTCCCTTCAAATCTATT-3'
Bisulfite seq	NANOG Forward	5'-AGAGATAGGAGGGTAAGTTTTTTTT-3'
Bisulfite seq	NANOG Reverse	5'-ACTCCCACACAACTAACTTTTATTC-3'
Integration	KLF4 Forward	5'-AATTACCCATCCTTCCTGCC-3'
Integration	KLF4 Reverse	5'-TTAAAAATGCCTCTTCATGTGTA-3'
Integration	OCT4 Forward	5'-TAAGCTTCCAAGGCCCTCC-3'
Integration	OCT4 Reverse	5'-CTCCTCCGGGTTTTGCTCC-3'
Integration	SOX2 Forward	5'-AGTACAACTCCATGACCAGC-3'
Integration	SOX2 Reverse	5'-TCACATGTGTGAGAGGGGC-3'
Integration	c-MYC Forward	5'-TCCACTCGGAAGGACTATCC-3'
Integration	c-MYC Reverse	5'-TTACGCACAAGAGTTCCGTAG-3'
Sequention	Mut218N Forward	5'-GCCAAAAACCAACATGAAGC-3'
Sequention	Mut218N Reverse	5'-CATGCTCGATCCTCTCTGG-3'

Supplementary Table 1: Primers used in Figure 1 and the analyses used for and their sequencing.

SUPPLEMENTARY TABLE 2

Antibody	Cat. No.	Origin	Supplier	Dilution
α -Fetoprotein	A0008	Rabbit	Dako	1:400
Actin	1A4	Mouse	Sigma	1:5000
AT8	MN1020	Mouse	Invitrogen	1:1000
DCX	Goat	Goat	Santa Cruz	1:100
FoxA2	AF2400	Goat	R&D Biosystems	1:100
GADPH	AB9485	Rabbit	Abcam	1:300
GATA4	sc-9053	Rabbit	Santa cruz	1:50
GFAP	Z0034	Rabbit	Dako	1:500
K280Tau-(ac)	AS-56077	Rabbit	Anaspec	1:500
Ki67	AB9260	Rabbit	Millipore	1:300
MAP2	M1406	Rabbit	Sigma	1:100
Nanog	AF1997	Goat	Everest Biotech	1:100
Nestin	AB5922	Rabbit	Chemicon	1:250
NeuN	MAB377	Mouse	Chemicon	1:250
Oct4	sc-5279	Mouse	Santa Cruz	1:100
Pax6	PRB-278P	Rabbit	Covance	1:100
PFH1	gift	Mouse	Prof. D. Harris	1:150
PrP (3F4)	MAB1562	Mouse	Prionics	1:500
Sox2	PA1-16968	Rabbit	Chemicon	1:500
SSEA3	MC-631	Rat	Hybridoma Bank Iowa	1:2
SSEA4	MC-813-70	Mouse	Hybridoma Bank Iowa	1:2
SMA	A5228	Mouse	Sigma	1:400
Tau5	MAB361	Mouse	Millipore	1:100
TRA-1-81	MAB4381	Mouse	Millipore	1:200
TUJ1	MMS-435P	Mouse	Covance	1:500

Supplementary Table 2: Antibodies used in the present study.

SUPPLEMENTARY TABLE 3

Test	Gene	Primer
qPCR	CALB1 Forward	5'- GACGGAAGTGGTTACCTGGA-3'
qPCR	CALB1 Reverse	5'- TGCCCATACTGATCCACAAA -3'
qPCR	NES Forward	5'- ACAGCCATAGAGGGCAAAGTGGTA -3'
qPCR	NES Reverse	5'- AAGGAACCTGGGAGTCCTGGATTT -3'
qPCR	SOX2 Forward	5'- GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG -3'
qPCR	SOX2 Reverse	5'- TTGCGTGAGTGTGGATGGGGATTGGTG -3'
qPCR	DCX Forward	5'- CATCCCCAACACCTCAGAAG -3'
qPCR	DCX Reverse	5'- GGAGGTTCCGTTTGCTGA -3'
qPCR	MAP2 Forward	5'- CCGTGTGGACCATGGGGCTG -3'
qPCR	MAP2 Reverse	5'- GTCGTCGGGGTGATGCCACG -3'
qPCR	MAPT Forward	5'- GATTGGGTCCCTGGACAATA -3'
qPCR	MAPT Reverse	5'- GTGGTCTGTCTTGGCTTTGG -3'
qPCR	GFAP Forward	5'- TCTCTCGGAGTATCTGGGAACTG -3'
qPCR	GFAP Reverse	5'- TTCCCTTTCTGTCTGAGTCTCA -3'
qPCR	VGLUT1 Forward	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGT -3'
qPCR	VGLUT1 Reverse	5'- GAAGATGGTGATGGGATTTC -3'
qPCR	GAPDH Forward	5'- CACGTGGTGGTGCAGAAA 3'
qPCR	GAPDH Reverse	5'- CGTGTATGAGGCCGACAGT -3'
qPCR	3R MAPT Forward	5'- GTCAGGTCGAAGATTGGCTCTACT -3'
qPCR	3R MAPT Reverse	5'- GCTTGTAAGTATTTGCACCTTGC -3'
qPCR	4R MAPT Forward	5'- TGTCAGGTCGAAGATTGGCTC -3'
qPCR	4R MAPT Reverse	5'- CTTATTAATTATCTGCACCTTGCCAC -3'

Supplementary Table 3: Primers used in the iPS cell differentiation (Fig. 3 and 4) and their sequencing.

Paper de PrP^C en l'excitotoxicitat induïda per àcid kaínic en diferents soques de ratolins

Patricia Carulla, Franc Llorens, **Andreu Matamoros-Angles**, Patricia Aguilar-Calvo, Juan Carlos Espinosa, Rosalina Gavín, Isidre Ferrer, Giuseppe Legname, Juan María Torres i José A. del Río[#].

Resum

La proteïna priònica cel·lular (PrP^C) s'ha associat amb una gran múltiples funcions cel·lulars des del cicle cel·lular fins a la neuroprotecció. Els ratolins genoanul·lats per aquesta proteïna (*Prnp*^{0/0}) mostren una major susceptibilitat a les convulsions epilèptiques, denotant la funció neuroprotectora de la PrP^C. Tanmateix, la manca de reproductibilitat experimental ha donat lloc a la possibilitat que altres factors, a més de l'absència de la PrP^C, com el fons genètic dels ratolins o la presència dels anomenats "*Flanking genes*", podrien contribuir a la susceptibilitat observada. En aquest treball es realitza una anàlisi comparativa de la susceptibilitat epilèptica en diferents ratolins *Prnp*^{0/0} de fons genètics B6129, B6.129, 129/Ola i FVB/N. El nostre estudi indica que la PrP^C juga un paper en la neuroprotecció en cèl·lules i ratolins tractats amb àcid kaínic. Per realitzar aquesta funció, la PrP^C ha de contenir la regió aa32-93 i ha d'ancorar-se a la membrana. Tot i això, alguns *Flanking genes* no identificats tindrien un paper paral·lel a la PrP^C en les resposta al KA en els models B6129 i B6.129 *Prnp*^{0/0}.

Referència

Carulla P, Llorens F, Matamoros-Angles A, Aguilar-Calvo P, Espinosa JC, Gavin R, Ferrer I, Legname G, Torres JM, del Río JA (2015). *Involvement of PrP(C) in kainate-induced excitotoxicity in several mouse strains*. Sci Rep 5:11971.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Involvement of PrP^C in kainate-induced excitotoxicity in several mouse strains

Received: 19 February 2015

Accepted: 12 June 2015

Published: 09 July 2015

Patricia Carulla^{1,2,3}, Franc Llorens^{1,2,3,4}, Andreu Matamoros-Angles^{1,2,3}, Patricia Aguilar-Calvo⁵, Juan Carlos Espinosa⁵, Rosalina Gavín^{1,2,3}, Isidre Ferrer^{6,7}, Giuseppe Legname⁸, Juan Maria Torres⁵ & José A. del Río^{1,2,3}

The cellular prion protein (PrP^C) has been associated with a plethora of cellular functions ranging from cell cycle to neuroprotection. Mice lacking PrP^C show an increased susceptibility to epileptic seizures; the protein, then, is neuroprotective. However, lack of experimental reproducibility has led to considering the possibility that other factors besides PrP^C deletion, such as the genetic background of mice or the presence of so-called “*Prnp* flanking genes”, might contribute to the reported susceptibility. Here, we performed a comparative analysis of seizure-susceptibility using characterized *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} mice of B6.129, B6.129, 129/Ola or FVB/N genetic backgrounds. Our study indicates that PrP^C plays a role in neuroprotection in KA-treated cells and mice. For this function, PrP^C should contain the aa32–93 region and needs to be linked to the membrane. In addition, some unidentified “*Prnp*-flanking genes” play a role parallel to PrP^C in the KA-mediated responses in B6.129 and B6.129 *Prnp*^{0/0} mice.

Although the role of the cellular form of the prion protein (PrP^C) in living organisms has been intensively studied, a clear consensus concerning the physiological functions of this protein is still elusive and controversial. To date, existing evidence implicates PrP^C in numerous distinct cellular processes, including cell proliferation and differentiation^{1,2}, copper homeostasis^{3,4}, oxidative stress⁵ and cell signaling^{6,7}, among others.

The generation of different transgenic *Prnp*^{0/0} mice (mixed B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} or co-isogenic 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} backgrounds) in the early 1990s did not reveal any relevant phenotypic alteration of the mutant mice^{8,9}. However, subsequent studies identified an abundance of phenotypic alterations (e.g.,¹⁰), including depressive-like behaviour¹¹, cognitive deficits¹², age-dependent behavioural abnormalities¹³, altered olfaction¹⁴, peripheral myelin deficits¹⁵, altered circadian rhythms¹⁶ and an increased susceptibility to oxidative stress⁵ and glutamate excitotoxicity^{17–19}. Indeed, different laboratories have described in these strains and in congenic B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} (B6.129 mice backcrossed with C57BL/6 for several generations) an enhanced sensitivity to seizures after the administration of epileptogenic drugs such as kainic acid (KA), N-methyl-D-aspartic acid (NMDA), pilocarpine and pentylenetetrazol (PTZ), suggesting a neuroprotective role of the protein against excitotoxic insults (e.g.,^{17–21}). However, some studies suggest that PrP^C is not involved in KA-mediated excitotoxicity and that the observed differences are likely

¹Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute of Bioengineering of Catalonia (IBEC), Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain. ²Department of Cell Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ³Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona, Spain.

⁴German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Robert-Koch Str. 40, 37075, Göttingen, Germany.

⁵Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), Valdeolmos, Madrid, Spain. ⁶Institut de Neuropatologia, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) Barcelona, Spain. ⁸Laboratory of Prion Biology, Department of Neuroscience, Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati (SISSA), Trieste, Italy.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.A.D.R. (email: jadelrio@ibecbarcelona.eu)

to be associated with the genetic background of the mice used in the experiments^{22–24}. In fact, it was described some years ago how different mouse strains exhibit different vulnerability to the administration of glutamate and other seizure-inducing drugs, which correlates with differences in axonal sprouting and cell death in the hippocampal region (e.g.,^{25,26}). For example, the hippocampus of the C57BL/6 background mouse, in contrast to FVB/N, is more resistant to the excitotoxic effects of KA^{25,27–29}. Thus, these genetic differences dilute the specific participation of PrP^C in KA-mediated cell death. However, these genomic influences do not *per se* explain the neuroprotective properties of PrP^C observed in KA-treated neuroblastoma cell lines carrying different dosages of the *Prnp* gene (see below).

In addition to these genetic differences, a number of *Prnp*-flanking genes associated with the 129 genotype in B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} mixed mice³⁰ have recently been described. These genes are retained in *Prnp*^{0/0} progeny of congenic B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} after numerous (>10) crosses^{30,31} with C57BL/6 mice. SNP analysis of the backcrossed mice indicated that after 5 to 6 rounds the amount of C57BL/6-associated SNP increased from ≈60 up to ≈93%. Thus, B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} wild type and mutant mice may still differ at these additional polymorphic loci associated with *Prnp*^{32,33}. One of these loci, the signal regulatory protein alpha (SIRPα) has recently been described as responsible for a previously PrP^C-associated phagocytic function in macrophages³³. More relevantly, overexpressing mice (Tg20) generated in mixed B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} congenic mouse carried several copies of the polymorphic loci, since in most cases they are also crossed with previously backcrossed B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} mice³⁰. In this scenario, it is reasonable to consider that the data obtained using *Prnp*^{0/0} or Tg20 (backcrossed or not with C57BL/6) in electrophysiological studies may yield conflicting results^{24,34–36}. Indeed, lack of PrP^C has been associated with long-term potentiation (LTP), GABA-mediated fast after hyperpolarization (AHP) and paired pulse facilitation (PPF) abnormalities in mutant mice (e.g.,^{37–40}). However, regulatory participation of PrP^C in neurotransmission and neuroprotection and in other cellular functions has also been shown with acute modulation of *Prnp* expression in neural cell lines and in other organisms (e.g., zebrafish) as models, to avoid the above-mentioned genetic problems of mice. For example, neuroblastoma (N2a) cells with reduced *Prnp* expression are more susceptible to KA in contrast to non-modified cells^{18,20}. Functions of PrP^C in neurotransmission are also reinforced since i) PrP^C seems to be located in the synaptic cleft^{20,41–43}; ii) several synaptic proteins (e.g., synaptophysin, synapsin Ib)^{44,45}, glutamate receptor subunits (e.g., GluR6/7, NR2D, GluR1/2, mGluR1/5)^{19,20,46,47} and ion channels³⁶ have been identified as interacting partners of PrP^C; iii) PrP^C regulates GluR6/7-mediated signalling through the modulation of the formation of the GluR6/7-PSD-95-MLK3 trimeric complex, which triggers the activation of the JNK3 apoptotic pathway in the hippocampus in response to KA administration²⁰; and iv) it modulates the NMDA receptor⁴⁸.

Due to these conflicting results, we aimed to clarify the participation of PrP^C in KA-mediated excitotoxicity *in vivo*, using B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl}, B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl}, 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} and FVB *Prnp*^{0/0} and *Prnp*^{1/1} mice, and *in vitro* using N2a cells. In addition, we wished to explore whether the expression of truncated forms of PrP^C (ΔF35 or ΔC4) lacking 32–134 and 32–93 residues of PrP^C might increase the neurotoxic effects.

Our results indicate that FVB/N *Prnp*^{0/0} mice are not suitable for the *in vivo* model of KA-mediated excitotoxicity due to the intrinsic sensitivity to KA of FVB/N mice that hides clear differences^{49,50}. More relevantly, both B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} and co-isogenic 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} mice display more severe epileptic episodes and neurotoxic brain damage than their corresponding wild-type controls. Backcrossed B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} mice (with ≈93% of C57BL/6 SNPs) displayed lower numbers of seizures compared to B6129, indicating additional participation of *Prnp*-linked genes in KA-mediated effects in B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} mice. However, our data using co-isogenic 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} (100% 129 genotype) and cell lines reinforce the notion that PrP^C is neuroprotective in KA treatment. In addition, the expression of ΔF35 and ΔC4 in a B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} background increased hippocampal cell death, especially in the CA3 region after KA injections. These *in vivo* data were also corroborated using N2a cells transiently expressing N-terminal truncated forms of PrP^C. Lastly, our *in vitro* experiments also suggest that to be neuroprotective, PrP^C should be bound to the plasma membrane by means of the GPI moiety.

Results

KA-induced seizures in several strains of wild-type and PrP^C-null mice. A gene-targeting strategy to generate null mutations in mice is a powerful research tool to reveal *in vivo* the function of a single protein, as derived phenotypic alterations are usually attributed to the deleted gene. Nevertheless, behavioural alterations observed in null-mutant mice could result in some cases from the genetic background (see introduction, see also^{26,49,50}). In order to determine a possible influence of non-*Prnp* genes in the susceptibility to KA-induced seizures, we compared the epileptic response in B6129 (n=20), 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} (n=9) and FVB/N *Prnp*^{0/0} (n=7) and wild type mice (B6129, n=16; 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} (n=11); FVB/N (n=8) (Fig. 1a and Supplementary Tables 1–6). A multiple administration protocol, consisting of three intraperitoneal injections of KA (10 mg/kg body weight) at 30 min intervals, was used in this experiment. Seizure intensity was analysed during the 4 hours after the first KA injection and scored as indicated in Methods. For an easier comparative analysis, data from grades I to IV were grouped together.

After the behavioural study, mice were numbered and kept in separate boxes until histological studies. Percentages of the different strains of mice reaching each stage were represented (Fig. 1a). As indicated

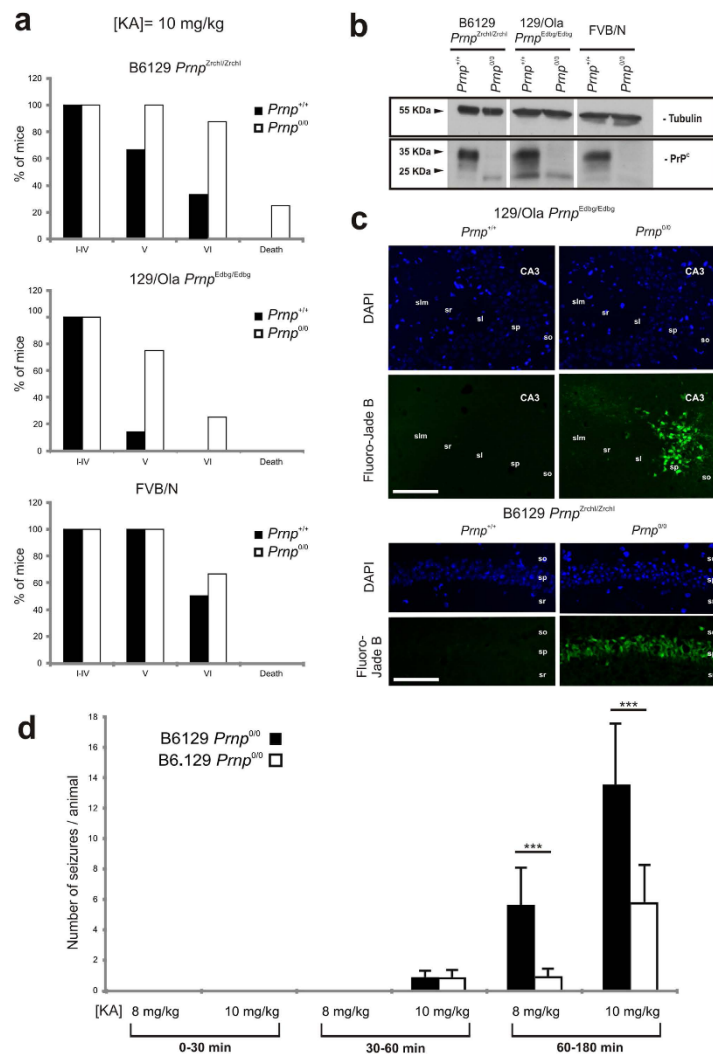


Figure 1. Comparison of KA-induced seizure profile in *Prnp^{+/+}* and *Prnp^{0/0}* mice on B6129, B6.129, 129/Ola or FVB/N genetic backgrounds. (a) Percentage of mice reaching seizure stages I to VI and KA-induced mortality. Adult animals were subjected to a multiple KA-injection protocol (10 mg/kg b.w.) and epileptic responses were analysed during 4 hours after the first KA injection (see Methods for details). (b) Example of the western blot detection of PrP^C (6H4) expression in brain extracts obtained from B6129 *Prnp^{Zrchl/Zrchl}* *Prnp^{+/+}*, B6129 *Prnp^{Zrchl/Zrchl}* *Prnp^{0/0}*, 129/Ola *Prnp^{Edbg/Edbg}* *Prnp^{+/+}*, 129/Ola *Prnp^{Edbg/Edbg}* *Prnp^{0/0}*, FVB/N *Prnp^{+/+}* and FVB/N *Prnp^{0/0}* mice. Tubulin was used as a loading control. (c) Photomicrographs showing the pattern of neurodegeneration (Fluoro-Jade B staining) and DAPI staining of hippocampus in B6129 *Prnp^{Zrchl/Zrchl}* *Prnp^{+/+}*, B6129 *Prnp^{Zrchl/Zrchl}* *Prnp^{0/0}*, 129/Ola *Prnp^{Edbg/Edbg}* *Prnp^{+/+}*, 129/Ola *Prnp^{Edbg/Edbg}* *Prnp^{0/0}*, 24 hours after KA treatment. Dying cells are mainly located in the pyramidal cell layer of CA1 and CA3 regions of B6129 *Prnp^{Zrchl/Zrchl}* *Prnp^{0/0}* and 129/Ola *Prnp^{Edbg/Edbg}* *Prnp^{0/0}* mice respectively. (d) Time course of stage VI seizure during the first 30 min, from 30–60 min and from 60–180 minutes, of adult B6129 *Prnp^{Zrchl/Zrchl}* *Prnp^{0/0}* vs B6.129 *Prnp^{Zrchl/Zrchl}* *Prnp^{0/0}* mice. Data are presented as the mean ± S.E.M. of the number of seizures/number of animals. Note the lower levels of seizures in parallel with decreased 129 associated genes in B6.129 *Prnp^{Zrchl/Zrchl}* *Prnp^{0/0}* mice. Abbreviations: sr, stratum radiatum; sl, stratum lucidum; slm, stratum lacunosum-moleculare; sp, stratum pyramidal; so, stratum oriens. Scale bar represents 200 μm. Asterisks indicate statistical significance (***) *P* < 0.01, Mann-Whitney *U* test).

(Fig. 1a and Supplementary Tables 1–6), all mice achieved stages I–IV, developing hypoactivity and immobility shortly after the first injection. When comparing wild type vs *Prnp*-null mice, significant differences were observed in the percentage of mice reaching stages V and VI, with the B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} and 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} much more susceptible to seizures than their respective *Prnp*^{+/+} controls (Fig. 1a and Supplementary Movies 1 and 2). In both groups, a high percentage of *Prnp*-null mice (100% and 75% respectively) developed loss of balance control and intermittent whole-body convulsions. More severe seizure activity, consisting of continuous seizures and/or ‘popcorn’ bouncing behaviour (stage VI) was also reported, leading to the death of 20% of the B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} mice tested. In contrast, no B6129 *Prnp*^{+/+} or 129/Ola *Prnp*^{+/+} mice reached stage VI or died during experiments.

Distinct results were obtained when analysing FVB/N mice, since no significant differences were observed between FVB/N *Prnp*^{+/+} and FVB/N *Prnp*^{0/0} animals, and only a 9% difference was observed between them (Fig. 1a and Supplementary Movie 3). FVB/N *Prnp*^{+/+} showed a high epileptic response at 10 mg/kg b.w. of KA (≈50%), which was not observed in B6129 *Prnp*^{+/+} (≈30%) and 129/Ola *Prnp*^{+/+} (0%); it occurred in all described behavioural stages, but without any reported deaths. Although other unknown factors might be involved, such phenotypical differences between *Prnp*^{+/+} mouse strains could be related to small differences in PrP^C expression levels, since our western blot analysis revealed lower PrP^C expression in FVB/N *Prnp*^{+/+} (0.623 ± 0.04) compared to 129/Ola *Prnp*^{+/+} (0.92 ± 0.038) mice ($t = 4.21$, mean diff. = 0.30; 95% CI of diff. = 0.66 to 0.54) but not between B6129 *Prnp*^{+/+} (0.84 ± 0.063) and FVB/N *Prnp*^{+/+} mice ($t = 3.104$, mean diff. = 0.22; 95% CI of diff. = 0. – 0.013 to 0.459), or between B6129 *Prnp*^{+/+} and 129/Ola *Prnp*^{+/+} ($t = 1.112$, mean diff. = –0.08; 95% CI of diff. = –0.3166 to 0.1566) (Fig. 1b and Supplementary Fig. 1). It has been previously reported that excitotoxic damage derived from KA administration primarily affects pyramidal cells from CA1 and CA3 regions of the hippocampus. To corroborate that the increased cell death is associated with PrP^C deletion, we focused on B6129 *Prnp*^{0/0} and 129/Ola *Prnp*^{0/0} mice. We obtained coronal brain sections (dorsal hippocampus) from these mice 24 hours after KA treatment and performed Fluoro-Jade B staining to determine the associated neurodegeneration in the hippocampus. Wild type mice were processed in parallel (Fig. 1c). B6129- *Prnp*^{0/0} mice displayed much more pronounced pyramidal cell damage, with higher numbers in CA1 than in CA3, than wild-type controls, in which no Fluoro-Jade B positive cells were observed. PrP^C-dependent differences were also detected between 129/Ola- *Prnp*^{0/0} and 129/Ola-*Prnp*^{+/+} although cell death appeared to be restricted mostly to the CA3 region (Fig. 1c).

Taken together, these results support the notion that the genetic background of the different *Prnp*^{0/0} mice plays a role in KA susceptibility^{22,23}, with the FVB/N background more prone to seizures than 129/Ola or the mixed genetic background B6129^{26,49}. The susceptibility of the FVB background^{49,50} probably masks participation of PrP^C at this specific KA-dosage.

More relevantly, the present results demonstrate a role of PrP^C in neuroprotection, since the phenotypic differences observed between *Prnp*^{0/0} and *Prnp*^{+/+} mice in B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} (Supplementary Movie 1) are also reproduced in co-isogenic 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} mice (Supplementary Movie 2).

Decreased seizures in B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} compared to B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} mice. In a second set of experiments we used B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} mice generated after crossing the original B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} mice with C57BL/6 mice over several generations. In these experiments, B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} mice were purchased directly from EMMA (Monterotondo, Italy) and they carried approximately ≈64% of C57BL/6 microsatellite markers (Charles River Laboratories) with ≈46% of non-C57BL/6 markers (129 in origin). We backcrossed these *Prnp*^{0/0} mice with C57BL/6 mice over several generations (8–10) to reduce the non-C57BL/6 microsatellite markers to ≈6.5–7%. The presence of C57BL/6 or 129 markers in all phenotypes used in the present study was determined by the genetic testing service at Charles River Laboratories. In the test, 110 microsatellite markers at approximately 15cM intervals were analyzed, spreading across the 19 autosomes and the X chromosome, which distinguishes among 129 microsatellite markers ranging from 92 to 94% of C57BL/6 (in B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} mice). Thus B6129 and B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} mice were treated with 8 mg/kg b.w. (B6129 $n = 8$ and B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} $n = 6$) or 10 mg/kg b.w. (B6129 $n = 8$ and B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} $n = 9$) of KA and the number of seizures was determined during the first 30 minutes, from 30 to 60 minutes and from 60 to 180 minutes postinjection. In this experiment each mouse received a KA injection every 30 minutes as above. Data revealed a relevant number of seizures in B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} mice compared with B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} (KA 8 mg/kg $P = 0.0021$; KA 10 mg/kg $P = 0.0086$; Mann-Whitney U test confidence interval (CI) = 95% (Fig. 1d and Supplementary Movie 1). In addition, the differences between the numbers of seizures can be observed in both KA concentrations (8 and 10 mg/kg b.w.). These data indicate that although PrP^C plays a role in the increased susceptibility to KA as demonstrated above, the 129 associated genes also play a role in the observed results.

Increased susceptibility in B6.129-*Prnp*^{0/0} and 129/Ola- *Prnp*^{0/0} correlates with enhanced cell death, inflammatory markers and astrogliosis. Parallel histological sections to those processed in Fig. 1 KA-induced astrocytic activation and inflammatory response in B6129-*Prnp*^{0/0} ($n = 5$), 129/Ola-*Prnp*^{0/0} ($n = 5$) mice at their respective controls ($n = 5$ each genotype) (Fig. 2a). Immunohistochemical analysis of GFAP-positive cells in the hippocampus of PrP^C-null mice (either B6129 or 129/Ola) revealed large numbers of positive cells in the hippocampal CA1-3 when compared to *Prnp*^{+/+} controls

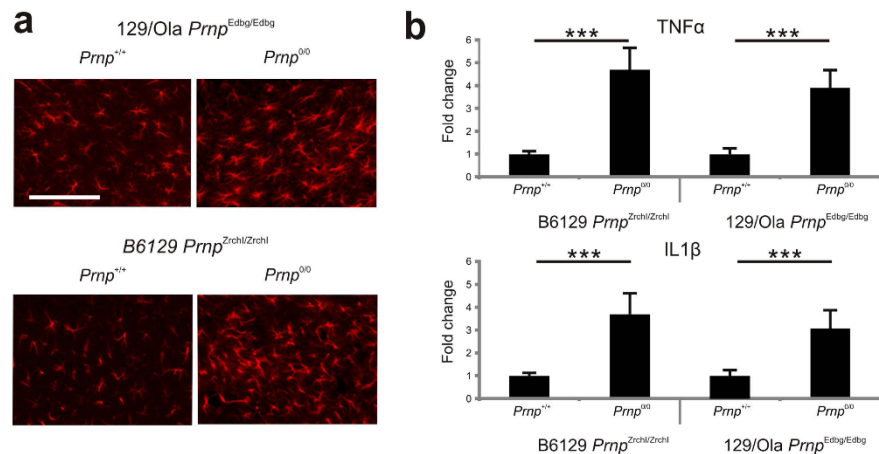


Figure 2. Increased astrogliosis, TNF α and IL1 β expression in the hippocampus of B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} and 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} *Prnp*^{0/0}. (a) Examples of GFAP-positive immunoreactive cells in the stratum radiatum of the hippocampal CA1-3, 24 hours after KA administration in hippocampal coronal sections of B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{+/+}, B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0}, 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} *Prnp*^{+/+}, 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} *Prnp*^{0/0}. Both *Prnp*-null mice show greater numbers of reactive astroglia than their wild-type controls. (b) RT-qPCR of TNF α and IL1 β mRNA levels from hippocampal RNA extracts obtained from B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{+/+}, B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0}, 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} *Prnp*^{+/+}, 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} *Prnp*^{0/0} mice 6 hours after the last KA treatment (at 60 minutes). Plotted data (mean \pm S.E.M.) were obtained from three independent experiments and represented as mean fold change induction. Abbreviations are as in Fig. 1. Scale bars represent 100 μ m. Asterisks indicate statistical significance (*** P < 0.01 Mann-Whitney U test).

(B6129-*Prnp*^{0/0} 75.7 ± 1.24 vs B6129-*Prnp*^{+/+} 43.4 ± 1.06 ; $P = 0.005$ Mann-Whitney U test. 129/Ola-*Prnp*^{0/0} 53.7 ± 1.44 vs 129/Ola-*Prnp*^{+/+} 42.9 ± 0.92 ; $P = 0.0047$ Mann-Whitney U test. Immunoreactive cells showed hypertrophic cell bodies and thicker glial processes (Fig. 2a). Moreover, quantitative real-time PCR data obtained from hippocampal samples 6 hours after KA-administration showed upregulation of the main pro-inflammatory markers TNF α (4.7-fold increase in B6129-*Prnp*^{0/0} ($n = 3$) $P = 0.0046$, Mann-Whitney U test and 3.8-fold increase in 129/Ola-*Prnp*^{0/0} ($n = 3$) ($P = 0.0008$, Mann-Whitney U test) vs respective wild type (B6129 $n = 3$ and 129/Ola $n = 3$) and IL1 β (3.7-fold increase in B6129-*Prnp*^{0/0} and 3.0-fold increase in 129/Ola-*Prnp*^{0/0} vs respective wild type (B6129-*Prnp*^{0/0} $P = 0.0046$ and 129/Ola *Prnp*^{0/0} $P = 0.0004$, and Mann-Whitney U test)) (Fig. 2b).

Chemical elimination of the GPI domain and of PrP^C reduces neuroprotection to KA in *Prnp*-transfected N2a cells. The GPI anchor in PrP^C, as in other GPI-proteins, is not only necessary for the stability and attachment of the protein to the cell surface, but also for its association to specialized membrane microdomains (e.g., lipid rafts), its intracellular traffic and signal transduction events. In addition, the GPI group has been suggested as playing a role in prion disease toxicity, as transgenic mice expressing secreted forms of PrP^C lacking its GPI-moiety showed no clinical symptoms despite accumulating PrP^{Sc} in plaques⁵¹. Because in our microsatellite analysis the C57BL/10-PrP^C mice (Tg44^{+/+} kindly provided by Dr. B. Chesebro) contained non-B10 regions in chromosome 3 and in chromosome 2 flanking the *Prnp* locus, we decided to check whether the degradation of the GPI binding domain of the PrP^C leading to a decreased PrP^C in the plasma membrane could overcome the neuroprotective function of PrP^C (Fig. 3a–c). In addition, this approach would determine whether the neuroprotective effect against KA treatment of PrP^C takes place at the membrane or intracellularly. Thus, N2a cells were treated either with Phospholipase C (PLC) enzyme or Glimepiride, a sulphonylurea approved for the treatment of diabetes mellitus, inducing the release of PrP^C from the surface of prion-infected neuronal cells, which releases PrP^C from the surface of neuronal cells⁵² (see methods for details). Decreased levels of PrP^C after treatments were detected with western blot (pcDNA = 0.39 ± 0.021 ; pcDNA-PrP^C = 0.91 ± 0.025 ; pcDNA-PrP^C + PLC = 0.45 ± 0.013 ; pcDNA-PrP^C + Gli = 0.496 ± 0.014) (Fig. 3a and Supplementary Fig. 2) or with immunocytochemistry in non-permeabilized cells (Fig. 3b) (pcDNA CTCF = 1.63 ± 0.09 ; pcDNA-PrP^C CTCF = 6.44 ± 0.12 ; pcDNA-PrP^C + Gli CTCF = 2.82 ± 0.20 ; pcDNA-PrP^C + PLC CTCF = 2.063 ± 0.15 . pcDNA vs pcDNA-PrP^C $t = 7.40$, mean diff. = -4.8 , 95% CI of diff. = -6.88 to -2.72 . pcDNA-PrP^C vs pcDNA-PrP^C + Gli $t = 5.31$, mean diff. = 3.6 , 95% CI of diff. = 1.43 to 5.78 . pcDNA-PrP^C vs pcDNA-PrP^C + PLC $t = 6.02$, mean diff. = 4.37 , 95% CI of

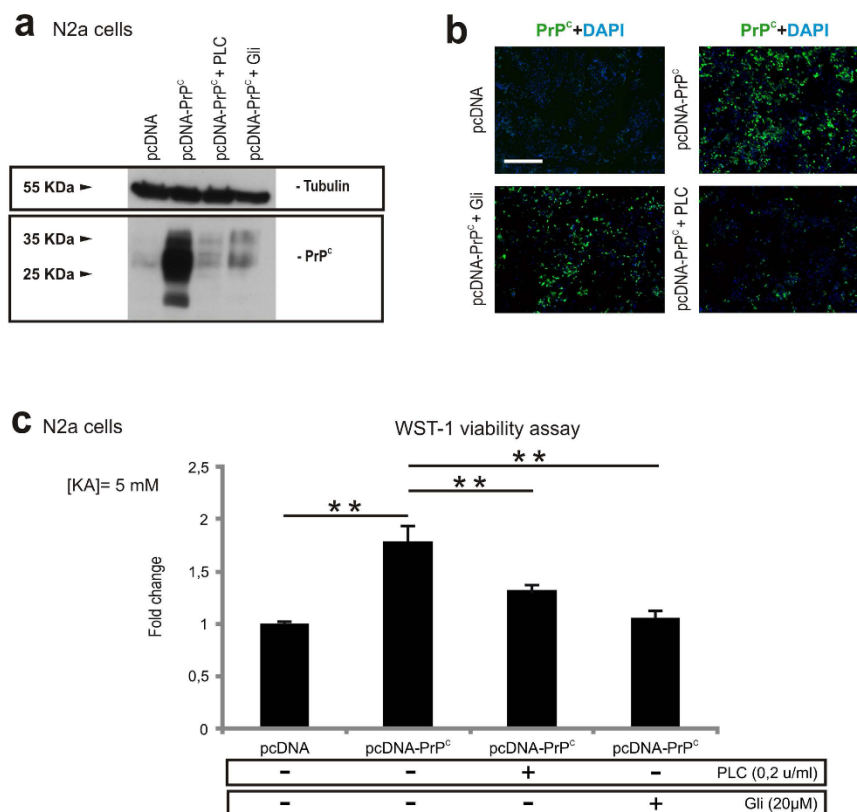


Figure 3. Chemical release of PrP^C from the cell surface impairs the neuroprotective function in KA-treated N2a cells. (a) Example of western blot determination of PrP^C levels in protein extracts of pcDNA, pcDNA-PrP^C, pcDNA-PrP^C + PLC and pcDNA-PrP^C + Gli treated N2a cells. (b) Microphotographs illustrating PrP^C levels in cells transfected with pcDNA or pcDNA-PrP^C, and treated with PLC (pcDNA-PrP^C + PLC) or Gli (pcDNA-PrP^C + Gli). PrP^C (green) was detected in non-permeabilized cells with 6H4 antibody. Note the decrease in PrP^C after PLC and Gli treatments in (a) and (b). (c) Histogram showing the decrease in surviving cells after KA-treatment (5 mM overnight) determined with the WST-1 viability test after PLC or Gli treatment of pcDNA-PrP^C transfected cells. Data (mean \pm S.E.M.) were obtained from three independent experiments and represented as mean fold change. Scale bars represent 100 μ m. Asterisks indicate statistical significance (** P < 0.05, Bonferroni *post hoc* test).

diff. = 2.04 to 6.70. WST-derived results indicate that both treatments increased the sensitivity to KA (pcDNA vs pcDNA-PrP^C t = 4.38, mean diff. = -0.27, 95% CI of diff. = -0.44 to -0.10. pcDNA-PrP^C vs pcDNA-PrP^C + PLC t = 2.789, mean diff. = -0.175, 95% CI of diff. = -0.34 to -0.005. pcDNA-PrP^C vs pcDNA-PrP^C + Gli t = 4.46, mean diff. = 0.28, 95% CI of diff. = 0.11 to 0.45 (Fig. 3c).

Enhanced cell death in the CA3 hippocampal region Δ F35 and Δ C4 mice compared to B6129 mice. *Prnp*^{0/0} Δ F35 (Δ F35) and *Prnp*^{0/0} Δ C4 (Δ C4) mice (Fig. 4a) were generated some years ago by nuclear injections of constructs into fertilized oocytes from B6129 *Prnp*^{7chll/7chll} mice⁵³. The number of copies of the construct was estimated as 25 for Δ C4 and 70 for Δ F35 mice. However, brain extracts obtained from these mice revealed similar levels of PrP- Δ C4 (*Prnp*^{1/1} = 0.755 \pm 0.075; PrP- Δ C4 = 0.81 \pm 0.03; P = 0.4; CI = 95%, Mann-Whitney *U* test) to wild-type but lesser amounts of PrP- Δ F35 than wild-type (*Prnp*^{+/+} = 0.91 \pm 0.01; PrP- Δ F35 = 0.70 \pm 0.021; P = 0.0048, CI = 95%, Mann-Whitney *U* test) (Fig. 4b and Supplementary Fig. 3). Nevertheless only Δ F35 mice showed cerebellar degeneration at around 60 days of life⁵³ (Supplementary Fig. 4). Irrespective of the cell type, the expression of the truncated form may induce *per se* cell death *in vivo*⁵⁴ as well as *in vitro*⁵⁵. Thus in the next experiments we treated these mice with 8 mg/kg b.w. of KA following the above-mentioned protocol. Behavioural results reported a similar evolution between Δ C4 (n = 11) and Δ F35 (n = 15)

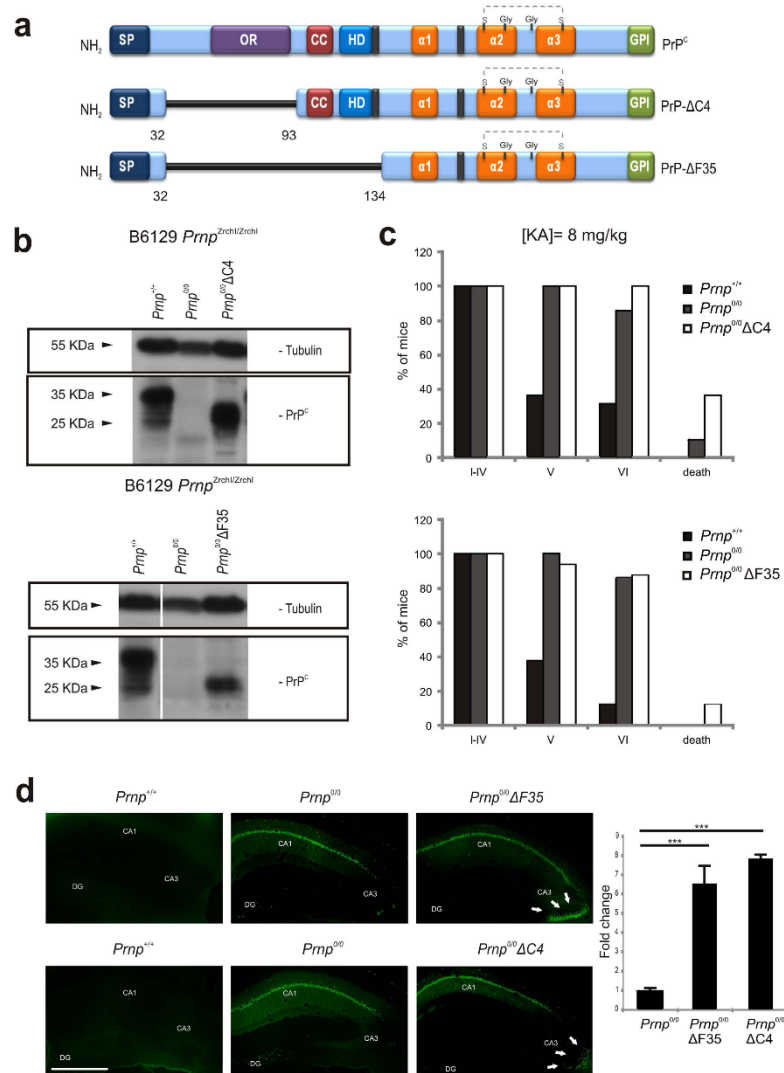


Figure 4. KA-induced seizures and neurotoxicity in ΔC4 and ΔF35 mice. **(a)** Scheme of PrP^C and N-terminal truncated forms overexpressed in B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} ΔC4 and B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} ΔF35 transgenic mice. **(b)** Example of western blot detection of PrP^C (6H4) expression in brain extracts obtained from untreated B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{+/+} and B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0}, B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} ΔC4 and B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} ΔF35 mice. Tubulin was used as a loading control. **(c)** KA-induced seizure sensitivity in adult B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} ΔC4 mice in comparison to B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{+/+} and B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} (upper panel). KA-induced seizure sensitivity in 5–7 week-old B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} ΔF35 mice in comparison to B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{+/+}, and B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} (lower panel). Bars represent the percentage of mice reaching each stage. **(d)** Fluoro-Jade B staining in hippocampal sections of B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{+/+}, B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0}, B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} ΔC4 and B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} ΔF35 mice 24 hours after KA treatment (8 mg/kg b.w.). The quantification of the Fluoro-Jade B-positive cells in the CA3 region is shown in the right plot. Scale bars represent 200 μm. Abbreviations: DG, Dentate gyrus; CA1–3, hippocampal regions 1 and 3; h, hilus; gl, granule cell layer; ml, molecular layer; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum-moleculare; sl, stratum lucidum; sp, stratum pyramidale; so, stratum oriens. Asterisks indicate statistical significance (****P* < 0.01, Bonferroni post hoc test).

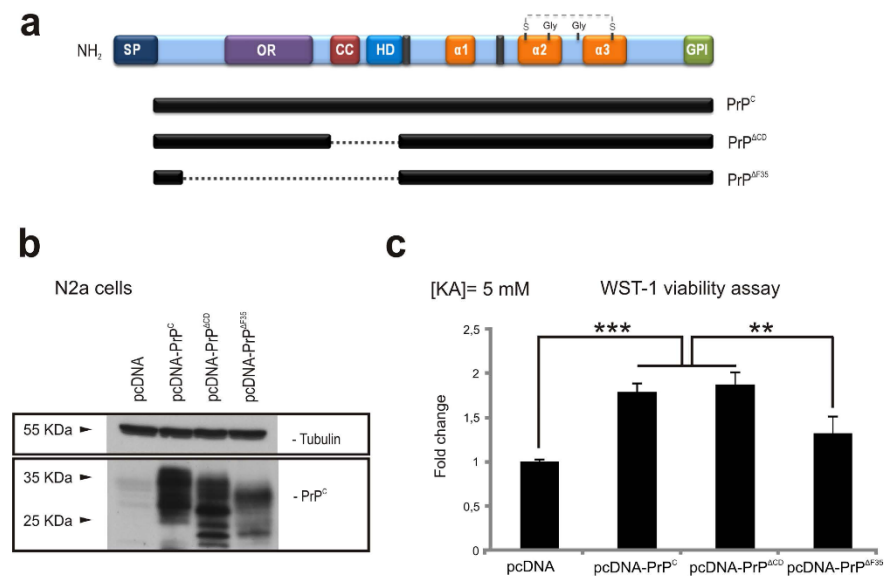


Figure 5. KA-excitotoxicity in N2a cells transiently transfected with PrP^C or PrP^{ΔCD} and PrP^{ΔF35} constructs. (a) Scheme illustrating domain organization in PrP^C and its related PrP^{ΔCD} and PrP^{ΔF35} mutants. (b) Example of western blot determination of the different PrP^C constructs employed in the experiment. (c) WST-1 viability assay performed over N2a cells previously transfected with pcDNA3.1 (empty vector, pcDNA), pcDNA-PrP^C, pcDNA-PrP^{ΔCD} and pcDNA-PrP^{ΔF35} and treated overnight with 5 mM KA. Data were normalized with untreated controls. A clear reduction in cell viability was observed in pcDNA-PrP^{ΔF35} transfected cells when compared to those overexpressing pcDNA-PrP^C. In contrast, pcDNA-PrP^{ΔCD} transfected cells showed similar viability to pcDNA-PrP^C transfected cells. Histograms represent the mean ± S.E.M. of three different experiments. Asterisks indicate statistical significance (***P* < 0.05, ****P* < 0.01, Bonferroni *post hoc* test).

mice compared to B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} (*n* = 35) and B6129 *Prnp*^{+/-} (*n* = 30) (Fig. 4c and Supplementary Movie 4). However, the number of dead was greater in ΔC4 (≈38%) and ΔF35 (≈15%) compared to B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} mice. These results also correlate with an increased presence of Fluoro-Jade B cells observed in histological sections of the hippocampus, especially in the CA3 region (ΔF35 = 87.12 ± 0.41; ΔC4 = 104.62 ± 0.088; B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} = 13.37 ± 0.055, B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} vs ΔF35 *t* = 7.577; mean diff. = -73.75, 99% CI of diff. = -115.4 to -32.1. B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} vs ΔC4 *t* = 9.375; mean diff. = -91.25, 99% CI of diff. = -132.9 to -49.6, Bonferroni *post hoc* test). (Fig. 4d). Taken together, these results indicate that the expression of the truncated form including the octarepeat region (OR) with or without the Central Domain (CD) of PrP^C potentiates the effects of the KA (<10 mg/kg b.w.), and they highlight the octarepeat domain as a key candidate in the neuroprotective functions of PrP^C.

Acute transfection of pcDNA-PrP^{ΔCD} but not pcDNA-PrP^{ΔF35} protects N2a cells from KA excitotoxicity *in vitro*. In order to corroborate *in vitro* the participation of the OR in PrP^C-mediated neuroprotection to KA, we performed a viability assay using N2a cells. Cells were transfected with vectors encoding either the full length of *Prnp* or two truncated forms lacking CD (PrP^{ΔCD}, residues 95–133), which bridge the flexible amino proximal tail and the globular carboxy proximal domain, or else a longer deletion including the central domain (CD) plus the OR (PrP^{ΔF35}, residues 32–134) (Fig. 5a). After transfection, levels of PrP^C and its truncated forms in transfected cells were checked with western blotting (Fig. 5b and Supplementary Fig. 5). In addition, the expression of the truncated forms was strictly modulated to avoid inducing cell death during the experiments. Transfected cells were treated overnight with 5 mM KA and further processed to WST-1 assays. Colorimetric WST-1 assay showed that PrP^C and PrP^{ΔCD} transfection increased cell culture viability after KA treatment, an effect that was not observed in PrP^{ΔF35} transfected cells (pcDNA = 0.54 ± 0.005; pcDNA-PrP^C = 0.94 ± 0.06; pcDNA-PrP^{ΔCD} = 1.047 ± 0.012 and pcDNA-PrP^{ΔF35} = 0.88 ± 0.03. pcDNA vs pcDNA-PrP^C *t* = 36.18; mean diff. = -0.4, 99% CI of diff. = -0.45 to 0.34. pcDNA vs pcDNA-PrP^{ΔCD} *t* = 45.83; mean diff. = -0.506, 99% CI of diff. = -0.55 to 0.45. pcDNA-PrP^{ΔCD} vs pcDNA-PrP^{ΔF35} *t* = 15.08, mean diff. = 0.166, 95% CI of diff. = 0.1282 to 0.20).

pcDNA-PrP^C vs pcDNA-PrP^{A35} $t = 5.42$, mean diff. = 0.06, 95% CI of diff. = 0.021 to 0.09) (Fig. 5c). These results reinforce the idea of the OR domain participating in the described neuroprotective role of PrP^C to excitotoxic damage in N2a cells.

Discussion

Role of PrP^C in neuroprotection against KA. The diversity of phenotypic changes described in *Prnp*-knockout mice has hindered the study of the physiological function of PrP^C¹⁰. In fact the reported differences between *Prnp*^{-/-} and *Prnp*^{0/0} mice have led to certain controversial results, especially in terms of electrophysiology and susceptibility to excitotoxic insults. Several pieces of evidence, including some from previous studies by our group using B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} 2,18,21,40, support the idea that *Prnp*-knockout mice are more susceptible to KA, NMDA and PTZ, exhibiting an enhanced epileptic response and neurotoxicity in the hippocampus when compared to wild type controls^{17,19}. Contradictory results have been published by other groups, who described an elevated threshold for epileptiform activity in *Prnp*^{0/0} hippocampal slices exposed to bicuculline, PTZ or zero-magnesium conditions²⁴. Similar discrepancies have been found when analysing neurotransmission-associated parameters in mice devoid of PrP^C^{34,35,37,38}. Due to this lack of reproducibility between groups, the possibility that reported phenotypes could be attributed to external factors, such as different mouse strains (e.g.,²⁵ or ³²) or experimental procedures (age of mice, KA concentration, treatments, etc.) must be strongly considered. Indeed, age-dependent loss of LTP in PrP^C-null mice^{26,57} has also been identified.

More recently, a comparative analysis between *Prnp*-knockout mouse strains has led to the proposal that the increased sensitivity to KA-induced seizures in *Prnp*-knockout mice is not associated with the absence of the protein but rather with inappropriate comparison with wild-type controls that differ in genetic background^{22,23,58}. In this study, background influence in susceptibility to excitotoxic damage was corroborated by evaluating the onset of epileptic seizure of wild-type mice from B6.129, B6.129,129/Ola and FVB/N strains. Our results show that FVB/N wild-type mice showed more seizures than B6.129 and 129/Ola mice, corroborating previous studies^{25,26,59}. In addition, 129/Ola wild-type showed increased expression of PrP^C that may also reduce the number of grade VI seizures.

In our study we observed the relevant effects of intraperitoneal injection of KA in B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} (with ≈46% 129 microsatellites), B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} (with ≈6–7% 129 microsatellites) and 129/Ola-*Prnp*^{0/0} mice (with 100% 129 background) compared with the appropriate wild-type controls. Results indicate a decline in the epileptic seizures when low numbers of 129 microsatellites are present in B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0}. These results point to polymorphisms of some of the “*Prnp*-flanking genes” as masking the participation of PrP^C in neuroprotection, as reported in other processes³⁰. Analysis of the 9 genes functions using gene ontology and Pubmed searches indicates that *Prex1*⁶⁰, *SIRPα*⁶¹, *Traf1*⁶², *Thbs1*^{63,64}, *Rmdn3*⁶⁵, *Tyro3*^{66,67}, *Slc30a4*⁶⁸, *Mertk*⁶⁹ and *B2m*⁷⁰ are involved in neurotransmission, LTP and neuroprotection. Whether polymorphisms in these genes participate in these effects warrants further study. However, the phenotypic differences observed between 129/Ola *Prnp*^{+/-} and 129/Ola *Prnp*^{0/0} mice could only be associated with *Prnp*-deletion, as no possible genetic variability exists between the two. These results differ from those recently published by Striebel and coworkers²³ who didn't observe PrP^C-linked neuroprotection despite using the same mouse strain. These contradictory results may be due to KA-dosage or to minor differences in the experimental procedure. Furthermore, we must not forget that this neuroprotective property of PrP^C is further supported by other *in vivo* models, such as transient knockdown of *Prnp* homologs in zebrafish⁷¹, and also some *in vitro* experimental approaches including PrP^C downregulation and detachment of the plasma membrane in neuronal primary cultures and neuroblastoma cell lines (^{18–20} and present results).

In conclusion, our findings support the notion that PrP^C is involved in neuroprotection to KA-induced seizures and excitotoxicity and that it actively participates in the increased epileptic response observed in mice devoid of PrP^C. In parallel, as yet unknown factors associated with *Prnp*-flanking genes also affect KA susceptibility.

The neuroprotective function of PrP^C depends on membrane anchoring. Our results indicate that the neuroprotective function of PrP^C against KA in N2a cells depends on membrane anchoring. The interaction of different regions of PrP^C with plasma membrane through the GPI domain has been considered necessary to induce the clinical symptoms in GPI-negative transgenic mice (C57BL/10-PrP^{GPIless} mice)^{51,72}. In fact, the injection of antibodies directed to the α1 and α3 regions of the PrP^C induces neurotoxic effects⁷³. These results have also been corroborated in newly developed mice lacking the globular domain (FTgpi mice)⁷⁴. In fact, these results corroborate previous observations⁷⁵. Taken together, these studies suggest that the proximity of the flexible tail (N-terminal domain) to the plasma membrane triggers intracellular oxidative stress responses leading to cell death^{74,76}. Under this scenario we can consider that our data reinforce the idea that the integrity of the N-terminal domain is mandatory for neuroprotection (see below) as well as the notion that membrane interaction is a necessary part of the neuroprotective function reported *in vivo*.

The neuroprotective function of PrP^C is abolished in the absence of the OR of PrP^C. Structural analysis of PrP^C architecture has determined different functionally relevant domains in this protein (see^{77,78} for review). Besides the highly conserved hydrophobic domain, the flexible and unstructured

N-terminus region includes a copper binding site consisting of four tandem repeats of the sequence PHGGGWGQ, which seems to be involved in the endocytic process of the protein⁷⁹ and copper homeostasis³. In fact a recent study indicates a relevant role of copper binding in the neuroprotective function of PrP^C modulating NMDA receptor⁴⁸. In our study we developed *in vivo* as well as *in vitro* tests to check the involvement of the OR domain as a mediator of PrP^C neuroprotective function in a model of KA treatment. The behavioural and histological data presented here by $\Delta C4$ and $\Delta F35$ mice revealed increased cell death in the hippocampus of the KA injected mice compared to B6129 *Prnp*^{0/0} (genetic background of these mice). In parallel, the CD is not involved in the neuroprotective functions of PrP^C (at least in N2a cells) since their absence does not modify these properties when compared to full length PrP^C, in contrast to the absence of the OR regions.

The overexpression of PrP- $\Delta F35$ in a B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} background leads to cerebellar neurodegeneration⁵³, but not hippocampal degeneration⁵⁵ (Supplementary Fig. 4). In contrast, $\Delta C4$ mice (with similar background) do not show cerebellar or hippocampal degeneration, but when subjected to controlled ischemia show significantly greater oxidative stress damage when compared to wild type mice⁸⁰. This also happens when PrP- $\Delta F35$ is overexpressed in HEK293 cells, leading to increased Caspase 3 activity in transfected cells and cell death⁵⁵. Truncated forms of PrP^C lacking the OR interfere with PrP^C endocytosis via clathrin-coated vesicles and beta-cleavage of PrP^C, respectively, thereby impairing the antioxidative functions of PrP^C^{81,82}. Thus it is reasonable to consider that cells with an intrinsic deficit in oxidative stress homeostasis may also be more prone to KA treatment if the appropriate KA receptors are also expressed, as happens in the hippocampus^{83–85}.

As indicated above, using antibody-mediated degeneration, Sonati *et al.*, demonstrated that ligands directed to the $\alpha 1$ and $\alpha 3$ helices of the PrP^C globular domain induce cerebellar cell death by activating oxidative stress that can be overcome by deletions in the OR region⁷³. This also happens in FTgpi mice lacking the $\alpha 1$ – $\alpha 3$ helix region of the PrP^C⁷⁴. In addition, mice lacking the ΔCD also reported white matter pathology and peripheral neuropathy⁸⁶. Surprisingly, the reported degeneration of the ΔCD mice could be reversed by coexpression of PrP^C lacking all octarepeats⁸⁶. These data are in contrast to a recent study indicating that the antibody ICSM18 (recognizing aa143–153 of PrP^C) does not induce cell death⁸⁷. In our experiments, we observed that cells transfected with PrP- ΔCD are able to overcome KA-mediated cell death as are those transfected with full length PrP^C, in contrast to PrP- $\Delta F35$ transfected N2a cells. Our *in vitro* experiments are different from the *in vivo* situation, since an effect of ligands in the CD regions is unlikely; rather, they suggest a parallel effect of KA excitotoxicity plus the homeostatic imbalance induced by the absence of the 32–93 region of the overexpressed PrP^C. Despite the existing data, the precise mechanism underlying OR-dependent neuroprotection remains to be elucidated in the above-mentioned studies^{73,87,88}.

In conclusion, our study dissects the effects of the intraperitoneal injection of various doses of KA in several *Prnp* mouse models and indicates that: i) PrP^C plays a role in neuroprotection in KA-treated cells and mice; ii) for this role PrP^C should be linked to the membrane; iii) polymorphisms of some unidentified “*Prnp*-flanking genes” play a parallel role to PrP^C in the KA-mediated responses in B6129 and B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} *Prnp*^{0/0} mice; and iv) the absence of the aa32–93 region negatively affects the neuroprotective function of PrP^C in KA-treated cells.

Methods

Reagents and antibodies. KA, glimepiride and phospholipase C were purchased from Sigma (Poole Dorset, UK). Fluoro-Jade B was from Millipore (Billerica, MA), SYBR green (Applied Biosystems, USA) and WST-1 reagents were from Roche (Basel, Switzerland). Lipofectamine plus was from Invitrogen (Carlsbad, CA). The following antibodies were used in this study: Anti-PrP SAF61 mouse monoclonal antibody (1:1000 diluted) antibody was from Spi-Bio (Cayman Chemical, Massy, France) and anti-PrP 6H4 mouse monoclonal antibody (1:5000 diluted western blotting and 1:250 immunocytochemistry) antibody was from Prionics (Schlieren, Switzerland). Mouse monoclonal antibody anti-tubulin (1:10000 diluted) was from Sigma (Poole Dorset, UK) and rabbit-raised polyclonal antibody against GFAP (1:500 diluted) was from Millipore (Billerica, MA).

Animals. Adult male C57Bl6/129sv-*Prnp*^{0/0} (B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} Zurich I) mice were purchased from the European Mouse Mutant Archive (EMMA, Monterotondo, Italy). The FVB/N animals were either wild-type or homozygous for the deletion of *Prnp* gene. 129/Ola *Prnp*^{Edbg/Edbg} *Prnp*^{+/+} and 129/Ola *Prnp*^{0/0} were obtained from Dr. J. Manson (Edinburgh). B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} mice were backcrossed for 8 generations to obtain 6–7% of 129 microsatellites (B6.129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl}). Transgenic B6129 *Prnp*^{0/0} PrP ^{$\Delta C4$} ⁸⁹ and B6129 *Prnp*^{0/0} PrP ^{$\Delta F35$} ⁵³ were obtained from Prof. A. Aguzzi. To avoid putative background-specific differences between mice, all of the experiments were conducted using littermates derived from heterozygous (*Prnp*^{+/-} $\Delta F35$) and *Prnp*^{0/0} parents. Specific primers for *Prnp* genotyping were designed in our laboratory based on the original P10 and P3 primers described elsewhere⁸. PrP ^{$\Delta F35$} transgene was detected by using 5'-CCTGGGACTCCTTCTGGTACCGGGTGACGC-3' and 5'-CAACCGAGCTGAAGCATTCTGCCT-3' set of primers and PrP ^{$\Delta C4$} with 5'-GGCTGGGCTTGTCCACTGATTATGGG-3' and 5'-CAACCGAGCTGAAGCATTCTGCCT-3'. Tg44^{+/-} mice expressing anchorless PrP^C⁵¹ on a C57Bl/10 background were obtained from Dr. Bruce Chesebro (Laboratory of Persistent Viral Diseases, Rocky Mountain Laboratories, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Hamilton, MT 59840,

USA). A total of 83 litters (193 animals) were used in the present study. All experiments were performed under the guidelines and protocols of the Ethical Committee for Animal Experimentation (CEEA) of the University of Barcelona, and the protocol for the use of animals in this study was reviewed and approved by the CEEA of the University of Barcelona (CEEA approval #115/11 and 141/15).

KA administration in mice and seizure analysis. Convulsive non-lethal seizures in mice were induced by administration of KA in a multiple dose protocol. Fresh KA solution was prepared for each experiment. Animals were weighed and intraperitoneally injected with 8 or 10 mg/kg KA (b.w.) dissolved in 0.1 M PBS, pH 7.2, at 0 min, 30 min and 60 min. In parallel mice, 0.1 M PBS, pH 7.2 was injected as control (vehicle). Adult (2–3 months old) animals were used in all experiments except for B6129 *Prnp^{Zrchl/Zrchl} Prnp^{0/0} Prp^{ΔC4} Prp^{ΔF35}* and their respective controls, which were used at 5–7 weeks-old due to their described early lethality⁵³.

After KA-injection mice were distributed in boxes (1–5 mouse/box) and the behaviour of the mice was recorded for 4 hours using a digital video camera (SONY DCR-HC30E Digital video camera). Seizure intensity was evaluated during the 4 hours after the first injection using the following criteria: grades I–II: hypoactivity and immobility, grades III–IV: hyperactivity and scratching, grade V: loss of balance control and intermittent whole-body convulsions and grade VI: continuous seizures and bouncing activity (commonly referred to as ‘popcorn’ behaviour). The characterization of seizure intensity was developed in two stages. First seizures were analysed *in situ* after KA-injections in the Molecular and Cellular Neurobiotechnology Laboratory (IBEC) by P.C., F.L.L. and A.M.-A. (B6129 *Prnp^{Zrchl/Zrchl} Zurich I*, B6.129 *Prnp^{Zrchl/Zrchl} Prnp^{0/0} Prp^{ΔC4}*, B6129 *Prnp^{0/0} Prp^{ΔF35}*, FVB/N *Prnp^{0/0}* mice strains and its respective controls) and in the Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA) by P.C., P.A.-C., J.C.E. (129/Ola *Prnp^{0/0}* and 129/Ola *Prnp^{Edbg/Edbg} Prnp^{+/+}*). After this initial characterization that included time of the appearance of seizures, scale of seizures, etc, video recordings of each experiment were analysed by J.A.D.R. at IBEC and J.M.T. at CISA-INIA without knowledge of the results of the previous *in situ* analysis. Afterwards, a contingency table was generated by comparing both analyses and the final data were plotted. Grades I to IV were grouped together for better data representation, as all animals tested reached these four epileptic stages. The statistical analysis of the obtained data was performed using Mann–Whitney *U* non-parametric test using Prism 5.0c (Mac OSX, Graphpad). Data are presented as percentage or as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). A value of ****P* < 0.01 was considered statistically significant.

Western blotting. Brain samples from non-treated mice were homogenized (10% wt/vol) in ice-cold lysis buffer—50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% (wt/vol) Triton X-100, 0.5% (wt/vol) Nonidet P-40 (IGEPAL; Sigma), glycerol 10%, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and protease and phosphatase inhibitors—using a motor-driven, glass-Teflon homogenizer in ice, and then centrifuged at 15,000g for 20 min. Protein concentration was quantified with BCA kit (Pierce). Protein extracts were boiled in Laemmli sample buffer at 100 °C for 5 min. Equal amounts of total protein were separated with 6–10% SDS-PAGE electrophoresis, electrotransferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore), and probed with indicated antibodies. Visualization of bound antibodies was performed using goat anti-mouse HRP (1:4000 diluted; Dako, Glostrup, Denmark) and the ECL Plus kit (Amersham-Pharmacia Biotech, GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA).

Densitometry and statistical processing of processed films. For quantification, developed films were scanned at 2400 × 2400 dpi (i800 MICROTEK high quality film scanner), and the densitometric analysis of the different PrP^C bands was performed in each case using Quantity One Image Software Analysis (Biorad). Each densitometric value of PrP^C and truncated form ΔC4, ΔF35 and ΔCD (0–255 gray scales) was normalized with the corresponding Tubulin densitometric values (0–255 gray scale). Three different experiments were used in each analysis unless specified. The statistical analysis of the obtained data was performed using Bonferroni *post hoc* test (Multiple comparison test) or Mann–Whitney *U* non-parametric test using Prism 5.0c (Mac OSX, Graphpad). Data are presented as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). A value of ***P* < 0.05 was considered statistically significant.

Fluoro-Jade B staining. Mice were perfused with 4% paraformaldehyde dissolved in 0.1 phosphate buffer, pH 7.3 24 hours after the first KA injection, post-fixed overnight in the same fixative, and cryoprotected in 30% sucrose. 30 μm-thick coronal brain sections were obtained in a freezing microtome (Leica, Wetzlar, Germany). Sections containing dorsal hippocampus (Bregma = −1.2 to −1.9⁹⁰) were rinsed for 2 h in 0.1 M Tris, pH 7.4, mounted and air dried at room temperature overnight. The next day, sections were pre-treated for 3 min in absolute ethanol, followed by 1 min in 70% ethanol and 1 min in distilled water. They were then oxidized in a solution of 0.06% KMnO₄ for 15 min. After three rinses of 1 min each in distilled water, the sections were incubated for 30 min in a solution of 0.001% Fluoro-Jade B (Chemicon) containing 0.01% of DAPI (Sigma) in 0.1% acetic acid. The slides were rinsed in deionized water for 3 min each, dried overnight, cleared in xylene, cover-slipped with Eukitt (Merck, Darmstadt, Germany) and examined using an Olympus (Hamburg, Germany) BX61 epifluorescence microscope. The statistical analysis of the obtained data was performed using Bonferroni *post hoc* test (Multiple

comparison test) using Prism 5.0c (Mac OSX, Grahpad). Data are presented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). A value of $***P < 0.01$ was considered statistically significant.

Histology and immunofluorescence. For histology, mice were perfused with phosphate buffered 4% paraformaldehyde, pH 7.3 24 hours after the first KA injection, post-fixed overnight in the same fixative, and cryoprotected in 30% sucrose as above. A freezing microtome (Leica, Wetzlar, Germany) was used to obtain 30 μ m-thick coronal sections, which were rinsed in 0.1 M PBS before 1 hour's incubation at room temperature in 0.1 M PBS containing 0.2% gelatin, 10% normal goat serum, 0.2% glycine, and 0.2% Triton X-100. Sections were then incubated overnight at 4°C with indicated primary antibodies. After washing in 0.1 M PBS containing 0.2% Triton X-100, sections were incubated with goat anti-rabbit Alexa Fluor 568-tagged secondary antibody (1:200 diluted; Molecular Probes, Eugene, OR, USA), washed in 0.1 M PBS and mounted in Fluoromount (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Immunohistochemical controls, which included omission or substitution of primary anti-GFAP antibody by either normal rabbit serum prevented immunostaining. For quantification of GFAP-positive astrocytes in the stratum radiatum of the dorsal hippocampal region, immunoreacted sections (5 sections of each mouse, $n = 5$ mice per genotype) were photodocumented with an Olympus BX61 fluorescence microscope equipped with a cooled DP12L camera. Photomicrographs were obtained using a 40X objective with identical time exposure (100–150 ms) between preparations from each wild-type and respective knockout mouse. No modifications were applied to the obtained pictures. Numbers of GFAP-expressing cells were determined by counting positive cells in five frames (250 \times 200 μ m) corresponding to the hippocampal CA1-3 regions of five mice of each genotype. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). The statistical analysis of the obtained data was performed using Mann–Whitney U non-parametric test using Prism 5.0c (Mac OSX, Grahpad). A value of $P < 0.01$ was considered statistically significant.

RT-qPCR. Total RNA from hippocampal samples obtained from treated (6 h after KA-administration) and non-treated mice was purified with the mirVana isolation kit (Ambion, Austin, TX, USA) and used to make the single-stranded cDNAs required as templates for the RT-qPCR amplification. Sets of primers used in this study were: for TNF α 5'- AGCAAACCAAGTGGAGGA- 3' and 5'-GCTGGCACCAGTGTGGTTGT- 3'; and for IL β 5'- TTGTGGCTGTGGAGAAGCTGT- 3' and 5'- AACGTCACACACAGCAGTT- 3'. The reaction was performed with the Roche LightCycler 480 detector, using 2x SYBR Green Master Mix (Roche) as reagent, as indicated by the manufacturer. Amplification protocol consisted of a denaturation-activation cycle (95°C for 10 min) followed by 40 cycles of denaturation-annealing-extension (95°C, 15 sec; 60°C, 40 sec; 72°C, 5 sec; 98°C, continuous). LightCycler 480 software was used for mRNA quantification. The data were analysed using the $\Delta\Delta C_t$ method, which provides the target gene expression values as fold changes in the problem sample compared with a calibrator sample. Both problem and calibrator samples were normalized by the relative expression of a housekeeping gene (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH]). These analyses developed 3 different samples. The statistical analysis of the obtained data was performed using Mann–Whitney U non-parametric test using Prism 5.0c (Mac OSX, Grahpad). Data are presented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). A value of $***P < 0.01$ was considered statistically significant.

Cell culture and treatments. The murine neuroblastoma cell line Neuro2a (N2a) expressing low levels of PrP^C was grown at 37°C, 5.5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 4.5 g/L glucose, 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (Invitrogen-Life Technologies, Barcelona, Spain). For vector transfection, cells were plated at 1×10^5 cells/well in a 24-well plate and transiently transfected the next day using Lipofectamine 2000 reagent in OptiMem medium, as indicated by the manufacturer (Invitrogen-Life Technologies). Four hours after transfection, cells were washed and the medium was replaced with DMEM containing 10% FBS. PrP^C expression after transfection was checked with western blot analysis. In a first set of experiments, N2a cell cultures were transiently transfected with pcDNA and pcDNA-PrP^C and maintained *in vitro* at 37°C, 5.5% CO₂. Cells were deprived for 24 h and treated with Glimepiride 20 μ M and 0.2 u/ml PLC (final concentration). We used both treatments since some reports indicate that Glimepiride may act on ATP-dependent K⁺ channels that may also affect cell survival⁹¹. One hour later, 5 mM KA dissolved in 0.1 M PBS was added to the media. After treatment, cultures were rinsed twice in KA-free culture medium, and cell viability was determined with WST-1 viability assay (see below). In parallel, non-permeabilized cells were processed to PrP^C detection by immunofluorescence using the 6H4 antibody and a goat anti-mouse Alexa Fluor 488-tagged secondary antibody (1:200 diluted; Molecular Probes). For fluorescence quantification of cell-bound Alexa Fluor 488, immunoreacted cultures ($n = 10$ per experimental group) were photodocumented with an Olympus BX61 + DP12L camera. Photomicrographs were obtained using a 20X objective with identical time exposure (250–300 ms) for preparations from each group. No modifications were applied to the obtained pictures. Fluorescence intensity was determined using ImageJ by measuring the corrected total cell fluorescence (CTCF) as: CTCF = integrated density – (area of selected N2a measured cells \times mean fluorescence of background). Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). The statistical analysis of the obtained data in these experiments was performed using Bonferroni *post hoc*

test (Multiple comparison test) using Prism 5.0c (Mac OSX, Grahpad). A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. These experiments were repeated four times. In a second set of experiments, N2a cells were transfected with pcDNA3.1, pcDNA3.1-PrP^C, pcDNA3.1-PrP^{ΔCD} and pcDNA3.1-PrP^{ΔF35}. KA (5mM) treatment was carried out on serum-deprived cells 24h after transfection. Cell viability was determined using a commercially available WST-1-based assay. Cell cultures were incubated with WST-1 reagent for 2 hours. Then absorbance at 450 nm was measured in a multiwell plate reader (Merck ELISA System MIOS). Data were normalized with A450 in untreated controls. pcDNA3.1-PrP^C, pcDNA3.1-PrP^{ΔCD} and pcDNA3.1-PrP^{ΔF35} were kind gifts from Prof. D. Harris (Boston University) and Prof. A. Aguzzi (University Hospital of Zurich). These experiments were repeated five times. The statistical analysis of the obtained data in these experiments was performed using Bonferroni *post hoc* test (Multiple comparison test) using Prism 5.0c (Mac OSX, Grahpad). Data are presented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Values of $**P < 0.05$ and $***P < 0.01$ were considered statistically significant.

References

1. Steele, A. D., Emsley, J. G., Ozdinler, P. H., Lindquist, S. & Macklis, J. D. Prion protein (PrP^C) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 3416–3421 (2006).
2. Llorens, F. *et al.* PrP(C) regulates epidermal growth factor receptor function and cell shape dynamics in Neuro2a cells. *J Neurochem* **127**, 124–138 (2013).
3. Brown, D. R. *et al.* The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature* **390**, 684–687 (1997).
4. Vassallo, N. & Herms, J. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J Neurochem* **86**, 538–544 (2003).
5. Brown, D. R., Nicholas, R. S. & Canevari, L. Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J Neurosci Res* **67**, 211–224 (2002).
6. Mouillet-Richard, S. *et al.* Signal transduction through prion protein. *Science* **289**, 1925–1928 (2000).
7. Hugel, B. *et al.* Modulation of signal transduction through the cellular prion protein is linked to its incorporation in lipid rafts. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2998–3007 (2004).
8. Bueler, H. *et al.* Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577–582 (1992).
9. Manson, J. C. *et al.* 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* **8**, 121–127 (1994).
10. Steele, A. D., Lindquist, S. & Aguzzi, A. The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. *Prion* **1**, 83–93 (2007).
11. Gadotti, V. M., Bonfield, S. P. & Zamponi, G. W. Depressive-like behaviour of mice lacking cellular prion protein. *Behav Brain Res* **227**, 319–323 (2012).
12. Criado, J. R. *et al.* Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis* **19**, 255–265 (2005).
13. Schmitz, M. *et al.* Loss of Prion Protein Leads to Age-Dependent Behavioral Abnormalities and Changes in Cytoskeletal Protein Expression. *Mol Neurobiol* (2014).
14. Le Pichon, C. E. *et al.* Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. *Nat Neurosci* **12**, 60–69 (2009).
15. Bremer, J. *et al.* Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci* **13**, 310–318 (2010).
16. Tobler, I. *et al.* Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**, 639–642 (1996).
17. Walz, R. *et al.* Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* **40**, 1679–1682 (1999).
18. Rangel, A. *et al.* Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. *J Neurosci Res* **85**, 2741–2755 (2007).
19. Khosravani, H. *et al.* Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Gen Physiol* **131**, i5 (2008).
20. Carulla, P. *et al.* Neuroprotective role of PrP^C against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7-PSD-95 binding. *Mol Biol Cell* **22**, 3041–3054 (2011).
21. Llorens, F. & Del Rio, J. A. Unraveling the neuroprotective mechanisms of PrP (C) in excitotoxicity. *Prion* **6**, 245–251 (2012).
22. Striebel, J. F., Race, B. & Chesebro, B. Prion protein and susceptibility to kainate-induced seizures: genetic pitfalls in the use of PrP knockout mice. *Prion* **7**, 280–285 (2013).
23. Striebel, J. F., Race, B., Pathmajeyan, M., Rangel, A. & Chesebro, B. Lack of influence of prion protein gene expression on kainate-induced seizures in mice: studies using congenic, coisogenic and transgenic strains. *Neuroscience* **238**, 11–18 (2013).
24. Ratte, S. *et al.* Threshold for epileptiform activity is elevated in prion knockout mice. *Neuroscience* **179**, 56–61 (2011).
25. Schauwecker, P. E. & Steward, O. Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: implications for gene targeting approaches. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 4103–4108 (1997).
26. McKhann, G. M., 2nd, Wenzel, H. J., Robbins, C. A., Sosunov, A. A. & Schwartzkroin, P. A. Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality, and hippocampal pathology. *Neuroscience* **122**, 551–561 (2003).
27. Schauwecker, P. E. Modulation of cell death by mouse genotype: differential vulnerability to excitatory amino acid-induced lesions. *Exp Neurol* **178**, 219–235 (2002).
28. Schauwecker, P. E. Complications associated with genetic background effects in models of experimental epilepsy. *Prog Brain Res* **135**, 139–148 (2002).
29. McCord, M. C., Lorenzana, A., Bloom, C. S., Chancer, Z. O. & Schauwecker, P. E. Effect of age on kainate-induced seizure severity and cell death. *Neuroscience* **154**, 1143–1153 (2008).
30. Nuvolone, M. *et al.* SIRPalpha polymorphisms, but not the prion protein, control phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med* **210**, 2539–2552 (2013).
31. Bribian, A. *et al.* Role of the cellular prion protein in oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation in the developing and adult mouse CNS. *PLoS One* **7**, e33872 (2012).
32. Gerlai, R. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci* **19**, 177–181 (1996).
33. Smithies, O. & Maeda, N. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5266–5272 (1995).
34. Herms, J. W., Kretschmar, H. A., Titz, S. & Keller, B. U. Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar purkinje cells of prion protein knockout mice. *Eur J Neurosci* **7**, 2508–2512 (1995).
35. Lledo, P. M., Tremblay, P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. & Nicoll, R. A. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 2403–2407 (1996).

36. Mercer, R. C. *et al.* The prion protein modulates A-type K⁺ currents mediated by Kv4.2 complexes through dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6. *J Biol Chem* **288**, 37241–37255 (2013).
37. Collinge, J. *et al.* Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**, 295–297 (1994).
38. Manson, J. C. *et al.* PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration* **4**, 113–114 (1995).
39. Whittington, M. A. *et al.* Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nature Genet* **9**, 197–201 (1995).
40. Rangel, A. *et al.* Regulation of GABA(A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. *PLoS One* **4**, e7592 (2009).
41. Fournier, J. G. Cellular prion protein electron microscopy: attempts/limits and clues to a synaptic trait. Implications in neurodegeneration process. *Cell Tissue Res* **332**, 1–11 (2008).
42. Brown, D. R. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci* **24**, 85–90 (2001).
43. Herms, J. *et al.* Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* **19**, 8866–8875 (1999).
44. Keshet, G. I., Bar-Peled, O., Yaffe, D., Nudel, U. & Gabizon, R. The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *J Neurochem* **75**, 1889–1897 (2000).
45. Spielhaupter, C. & Schatzl, H. M. PrP^C directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem* **276**, 44604–44612 (2001).
46. Watt, N. T. *et al.* Prion protein facilitates uptake of zinc into neuronal cells. *Nature Commun* **3**, 1134 (2012).
47. Beraldo, F. H. *et al.* Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1 chain. *FASEB J* **25**, 265–279 (2011).
48. Gasperini, L., Meneghetti, E., Pastore, B., Benetti, F. & Legname, G. Prion protein and copper cooperatively protect neurons by modulating NMDA receptor through S-nitrosylation. *Antioxid Redox Signal* **22**, 772–84 (2015).
49. Royle, S. J., Collins, F. C., Rupniak, H. T., Barnes, J. C. & Anderson, R. Behavioural analysis and susceptibility to CNS injury of four inbred strains of mice. *Brain Res* **816**, 337–349 (1999).
50. Schauwecker, P. E. Genetic basis of kainate-induced excitotoxicity in mice: phenotypic modulation of seizure-induced cell death. *Epilepsy Res* **55**, 201–210 (2003).
51. Chesebro, B. *et al.* Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* **308**, 1435–1439 (2005).
52. Bate, C., Tayebi, M., Diomedea, L., Salmons, M. & Williams, A. Glimepiride reduces the expression of PrP^C, prevents PrP^{Sc} formation and protects against prion mediated neurotoxicity in cell lines. *PLoS One* **4**, e8221 (2009).
53. Shmerling, D. *et al.* Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* **93**, 203–214 (1998).
54. Flechsig, E. *et al.* Expression of truncated PrP targeted to Purkinje cells of PrP knockout mice causes Purkinje cell death and ataxia. *EMBO J* **22**, 3095–3101 (2003).
55. Nicolas, O. *et al.* Bcl-2 overexpression delays caspase-3 activation and rescues cerebellar degeneration in prion-deficient mice that overexpress amino-terminally truncated prion. *FASEB J* **21**, 3107–3117 (2007).
56. Maglio, L. E., Martins, V. R., Izquierdo, I. & Ramirez, O. A. Role of cellular prion protein on LTP expression in aged mice. *Brain Res* **1097**, 11–18 (2006).
57. Curtis, J., Errington, M., Bliss, T., Voss, K. & MacLeod, N. Age-dependent loss of PTP and LTP in the hippocampus of PrP-null mice. *Neurobiol Dis* **13**, 55–62 (2003).
58. Crusio, W. E. Flanking gene and genetic background problems in genetically manipulated mice. *Biol Psychiatry* **56**, 381–385 (2004).
59. Ferraro, T. N. *et al.* Mouse strain variation in maximal electroshock seizure threshold. *Brain Res* **936**, 82–86 (2002).
60. Jackson, C., Welch, H. C. & Bellamy, T. C. Control of cerebellar long-term potentiation by P-Rex-family guanine-nucleotide exchange factors and phosphoinositide 3-kinase. *PLoS One* **5**, e11962 (2010).
61. Wang, L. *et al.* SHPS-1 deficiency induces robust neuroprotection against experimental stroke by attenuating oxidative stress. *J Neurochem* **122**, 834–843 (2012).
62. Lu, Y. Y. *et al.* TRAF1 is a critical regulator of cerebral ischaemia-reperfusion injury and neuronal death. *Nat Commun* **4**, 2852 (2013).
63. Hennekinne, L., Colasse, S., Triller, A. & Renner, M. Differential control of thrombospondin over synaptic glycine and AMPA receptors in spinal cord neurons. *J Neurosci* **33**, 11432–11439 (2013).
64. Okada-Tsuchioka, M. *et al.* Electroconvulsive seizure induces thrombospondin-1 in the adult rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **48**, 236–244 (2014).
65. Petri, M. K. *et al.* PTPIP51, a positive modulator of the MAPK/Erk pathway, is upregulated in glioblastoma and interacts with 14-3-3beta and PTP1B *in situ*. *Histol Histopathol* **26**, 1531–1543 (2011).
66. Ji, R. *et al.* TAM receptors affect adult brain neurogenesis by negative regulation of microglial cell activation. *J Immunol* **191**, 6165–6177 (2013).
67. Li, Q., Lu, Q., Lu, H. & Tian, S. Systemic autoimmunity in TAM triple knockout mice causes inflammatory brain damage and cell death. *PLoS One* **8**, e64812 (2013).
68. Aguilar-Alonso, P. *et al.* The increase in zinc levels and upregulation of zinc transporters are mediated by nitric oxide in the cerebral cortex after transient ischemia in the rat. *Brain Res* **1200**, 89–98 (2008).
69. Neher, J. J. *et al.* Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E4098–4107 (2013).
70. Nelson, P. A. *et al.* MHC class I immune proteins are critical for hippocampus-dependent memory and gate NMDAR-dependent hippocampal long-term depression. *Learn Mem* **20**, 505–517 (2013).
71. Fleisch, V. C. *et al.* Targeted mutation of the gene encoding prion protein in zebrafish reveals a conserved role in neuron excitability. *Neurobiol Dis* **55**, 11–25 (2013).
72. Baumann, F. *et al.* Functionally relevant domains of the prion protein identified *in vivo*. *PLoS One* **4**, e6707 (2009).
73. Sonati, T. *et al.* The toxicity of anti-prion antibodies is mediated by the flexible tail of the prion protein. *Nature* **501**, 102–106 (2013).
74. Herrmann, U. S. *et al.* Prion Infections and Anti-PrP Antibodies Trigger Converging Neurotoxic Pathways. *PLoS Pathog* **11**, e1004662 (2015).
75. Zeng, F., Watt, N. T., Walmsley, A. R. & Hooper, N. M. Tethering the N-terminus of the prion protein compromises the cellular response to oxidative stress. *J Neurochem* **84**, 480–490 (2003).
76. Dupiereux, I. *et al.* Protective effect of prion protein via the N-terminal region in mediating a protective effect on paraquat-induced oxidative injury in neuronal cells. *J Neurosci Res* **86**, 653–659 (2008).
77. Watts, J. C. & Westaway, D. The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochem Biophys Acta* **1772**, 654–672 (2007).
78. Linden, R. *et al.* Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* **88**, 673–728 (2008).
79. Pauly, P. C. & Harris, D. A. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* **273**, 33107–33110 (1998).

80. Mitteregger, G. *et al.* The role of the octapeptide region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol* **17**, 174–183 (2007).
81. Sakudo, A. *et al.* Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 660–667 (2003).
82. Taylor, D. R., Watt, N. T., Perera, W. S. & Hooper, N. M. Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci* **118**, 5141–5153 (2005).
83. Martens, U., Capito, B. & Wree, A. Septotemporal distribution of [3H]MK-801, [3H]AMPA and [3H]Kainate binding sites in the rat hippocampus. *Anat Embryol (Berl)* **198**, 195–204 (1998).
84. Ong, W. Y., Leong, S. K., Garey, L. J., Reynolds, R. & Liang, A. W. An immunocytochemical study of glutamate receptors and glutamine synthetase in the hippocampus of rats injected with kainate. *Exp Brain Res* **109**, 251–267 (1996).
85. Hampson, D. R. *et al.* Localization of AMPA receptors in the hippocampus and cerebellum of the rat using an anti-receptor monoclonal antibody. *Neuroscience* **50**, 11–22 (1992).
86. Baumann, F. *et al.* Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *EMBO J* **26**, 538–547 (2007).
87. Klohn, P. C. *et al.* PrP antibodies do not trigger mouse hippocampal neuron apoptosis. *Science* **335**, 52 (2012).
88. Solfrosi, L. *et al.* Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis *in vivo*. *Science* **303**, 1514–1516 (2004).
89. Flechsig, E. *et al.* Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron* **27**, 399–408 (2000).
90. Slotnick, B. M. & Leonard, C. M. A stereotaxic atlas of the albino mouse forebrain. (U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Alcohol, Drug Abuse for sale by the Supt. of Docs., U.S. Govt. Print. Off., 1975).
91. Mathew, A. J., Raj, N. N., Sugappriya, M. & Priyadarshini, S. M. Modeling of ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 11 and inhibition mechanism of the natural ligand, ellagic acid, using molecular docking. *Adv Exp Med Biol* **680**, 489–495 (2010).

Acknowledgements

The authors thank Tom Yohannan for editorial advice and M. Segura for technical assistance. We thank Jesús R. Requena (CIMUS, Santiago de Compostela, Spain) for helpful comments on the manuscript. We also thank members of the Del Río, Torres, Ferrer and Legname groups for stimulating discussions and ideas. This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2012-32617), FP7-PRIORITY, the Generalitat de Catalunya (SGR2014-1218), CIBERNED (PI2014/02-4 and PRY-14-114), La Caixa Obra Social Foundation, La Marató de TV3 and the Basque Foundation of Health and Innovation Research (BIO12/AL/004) to JADR. R.G. was supported by Instituto Carlos Tercero (FIS, PI11-00075). I.F. was supported by FIS (PI1100968) and CIBERNED. J.M.T. was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (RTA2012-00004 and AGL2012-37988-C04 projects) and EU FP7 project 'Priority CT2009-222887'. G.L.'s funding was provided by the EU FP7 project 'Priority CT2009-222887'. P.C. was supported by AGAUR, and A.M.-A. was supported by a fellowship from the Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno. P. A.-C. was supported by a fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BES-2010-349 040922).

Author Contributions

P.C., F.L.I., A.M.-A., P.A.-C., R.G. and J.C.E. performed most of the experiments. I.F., J.M.T., G.L. and J.A.D.R. designed the project and wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

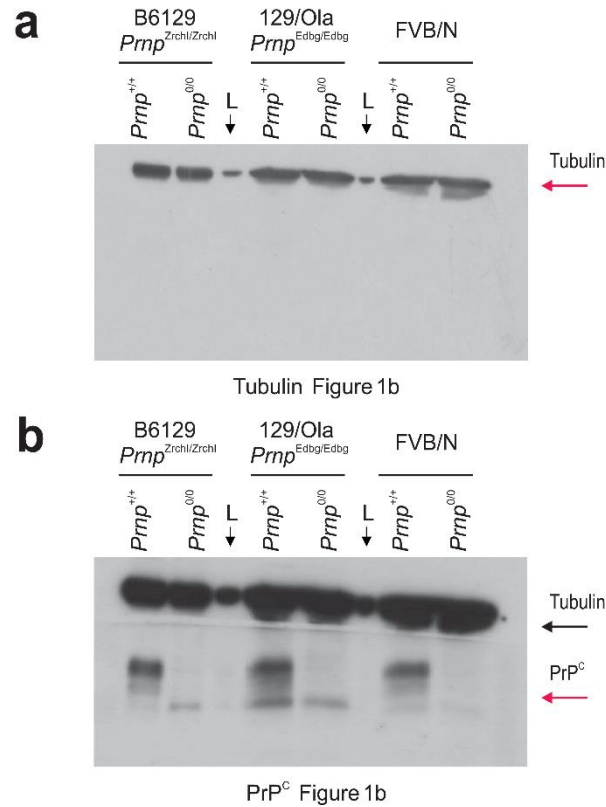
Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Carulla, P. *et al.* Involvement of PrP^C in kainate-induced excitotoxicity in several mouse strains. *Sci. Rep.* **5**, 11971; doi: 10.1038/srep11971 (2015).



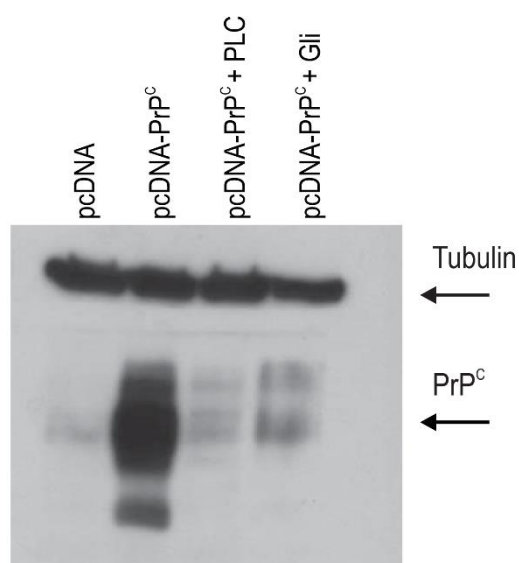
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

SUPPLEMENTARY FIGURE 1



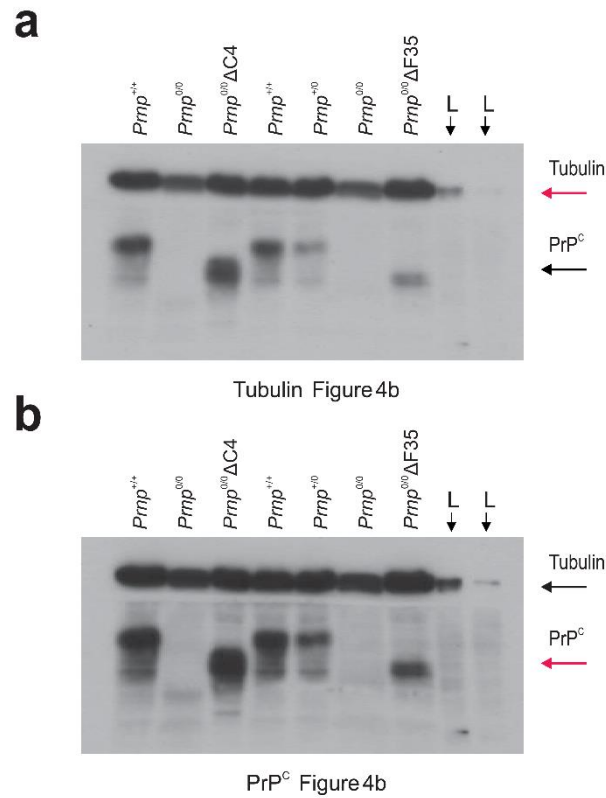
Supplementary Figure 1: Full size Western blot corresponding to Figure 1b for Tubulin and PrP^C levels in brain extracts from B6129 *Pmp^{Zrchl/Zrchl} Pmp^{+/+}*, B6129 *Pmp^{Zrchl/Zrchl} Pmp^{0/0}*, 129/Ola *Pmp^{Edbg/Edbg} Pmp^{+/+}*, 129/Ola *Pmp^{Edbg/Edbg} Pmp^{0/0}*, FVB/N *Pmp^{+/+}* and FVB/N *Pmp^{0/0}* mice. **(a)** 1 minute exposure. **(b)** 5 minutes exposure. L points to the ladder lines. Notice that the L lines were omitted in Fig. 1b. Red arrows points the portions of the Western blot showed in the Figure 1b.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2

Tubulin and PrP^C Figure 3a

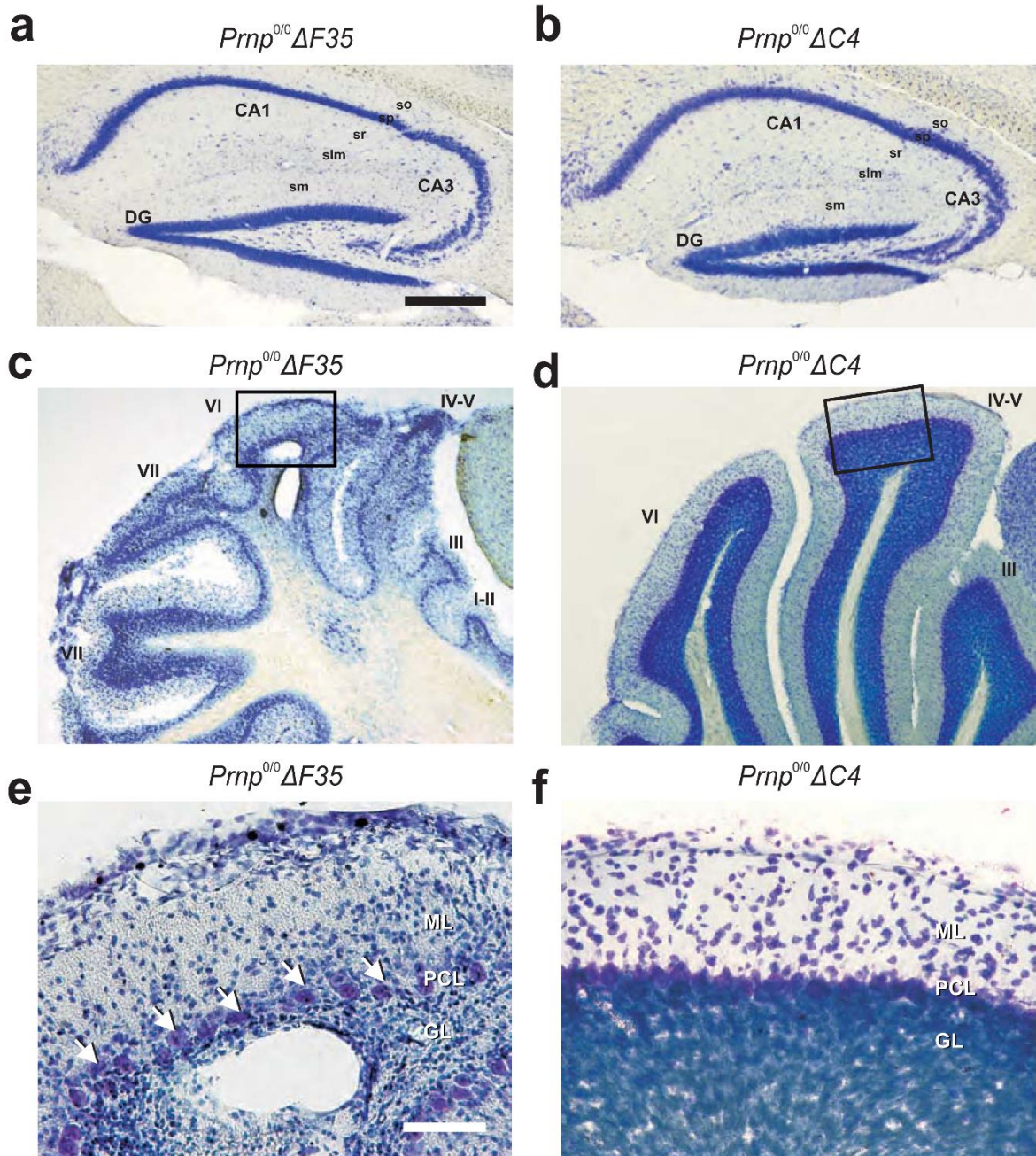
Supplementary Figure 2: Full size blot corresponding to Figure 3a for Tubulin and PrP^C levels in protein extracts of pcDNA, pcDNA-PrP^C, pcDNA-PrP^C + PLC and pcDNA-PrP^C + Gli treated N2a cells. Arrows point proteins of interest (Tubulin and PrP^C).

SUPPLEMENTARY FIGURE 3



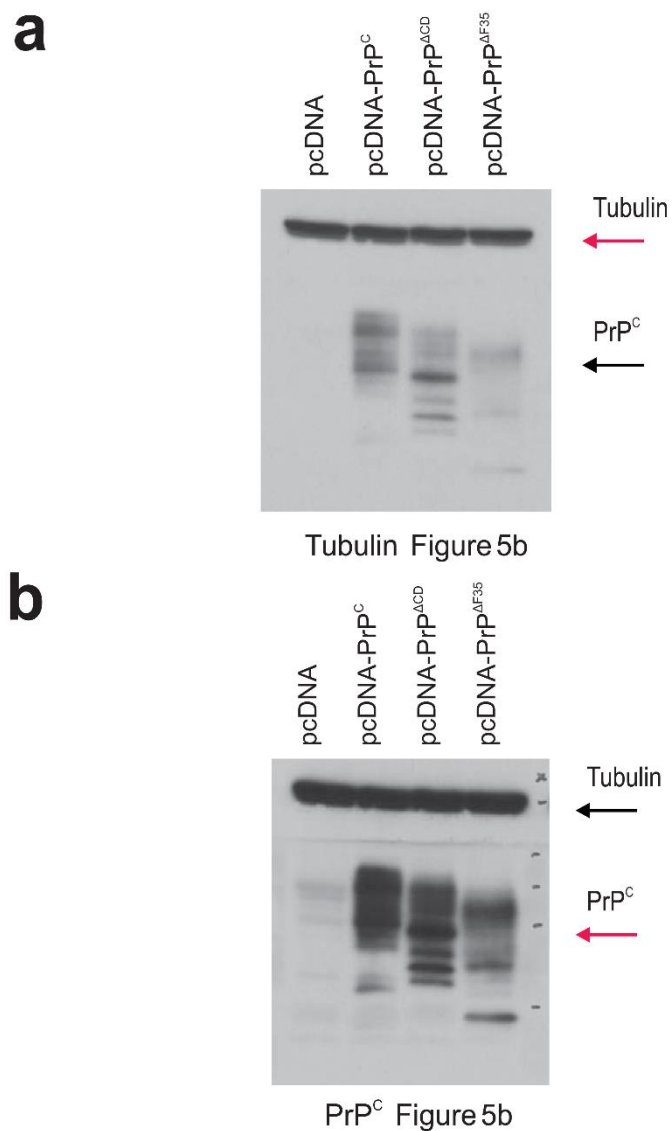
Supplementary Figure 3: Full size Western blot corresponding to Figure 4b for Tubulin and PrP^C levels in brain extracts obtained from untreated B6129 *Pmp*^{Zrchl/Zrchl} *Pmp*^{+/+}, B6129 *Pmp*^{Zrchl/Zrchl} *Pmp*^{+/-} and B6129 *Pmp*^{Zrchl/Zrchl} *Pmp*^{0/0}, B6129 *Pmp*^{Zrchl/Zrchl} *Pmp*^{0/0} ΔC4 and B6129 *Pmp*^{Zrchl/Zrchl} *Pmp*^{0/0} ΔF35 mice. **(a)** 2 minutes exposure. **(b)** 5 minutes exposure. L points to the ladder lines. Notice that the L lines and the lines showing B6129 *Pmp*^{Zrchl/Zrchl} *Pmp*^{+/-} were omitted in Fig. 4b. Red arrows points the portions of the Western blot showed in the Figure 4b.

SUPPLEMENTARY FIGURE 4



Supplementary Figure 4: Neuronal death in $\Delta F35$ and $\Delta C4$ mice. Low power photomicrographs of Nissl-stained sagittal sections of the hippocampus (**a,b**) and cerebellum (**c-f**) of $\Delta F35$ (**a,c,e**) and $\Delta C4$ (**b,d,f**) mice at 90 days. Note that the hippocampus (**a,b**) of both mutants remains healthy with a well defined pyramidal layer. In contrast, $\Delta F35$ mice showed relevant cerebellar degeneration starting in the granule cell layer in medial cerebellar folia (box in **c**). A higher magnification of the box in (**c**) is showed in (**e**). Arrows in (**e**) point to Purkinje cells and cerebellar folia numbering is included in (**c** and **d**). Abbreviations as in Figure 2 and ml = molecular layer; pcl = purkinje cell layer and gl = granule cell layer in (**e** and **f**). Scale bars: **a** = 200 μm pertains to **b-d**; **e** = 100 μm pertains to **f**.

SUPPLEMENTARY FIGURE 5



Supplementary Figure 5: Full size Western blot corresponding to Figure 5b for Tubulin and PrP^C levels in protein extracts of pcDNA, pcDNA-PrP^C, pcDNA-PrP^{ΔCD} and pcDNA-PrP^{ΔF35} treated N2a cells. **(a)** 2 minutes exposure. **(b)** 5 minutes exposure. Red arrows points the parts of the Western blot showed in the Figure 5b.

SUPPLEMENTARY TABLE 1

Animal Code	Seizure Intensity Reached			
	Grade I-IV	Grade V	Grade VI	Death
B6129.Wt.1				
B6129.Wt.2				
B6129.Wt.3				
B6129.Wt.4				
B6129.Wt.5				
B6129.Wt.6				
B6129.Wt.7				
B6129.Wt.8				
B6129.Wt.9				
B6129.Wt.10				
B6129.Wt.11				
B6129.Wt.12				
B6129.Wt.13				
B6129.Wt.14				
B6129.Wt.15				
B6129.Wt.16				

Supplementary Table 1: Description of seizure level reached by each B6129-Wt mouse

plotted in Figure 1a.

SUPPLEMENTARY TABLE 2

Animal Code	Seizure Intensity Reached			
	Grade I-IV	Grade V	Grade VI	Death
B6129.Ko.1				
B6129.Ko.2				
B6129.Ko.3				
B6129.Ko.4				
B6129.Ko.5				
B6129.Ko.6				
B6129.Ko.7				
B6129.Ko.8				
B6129.Ko.9				
B6129.Ko.10				
B6129.Ko.11				
B6129.Ko.12				
B6129.Ko.13				
B6129.Ko.14				
B6129.Ko.15				
B6129.Ko.16				
B6129.Ko.17				
B6129.Ko.18				
B6129.Ko.19				
B6129.Ko.20				

Supplementary Table 2: Description of seizure level reached by each B6129-Ko mouse

plotted in Figure 1a

SUPPLEMENTARY TABLE 3

Animal Code	Seizure Intensity Reached			
	Grade I-IV	Grade V	Grade VI	Death
129/Ola.Wt.1				
129/Ola.Wt.2				
129/Ola.Wt.3				
129/Ola.Wt.4				
129/Ola.Wt.5				
129/Ola.Wt.6				
129/Ola.Wt.7				
129/Ola.Wt.8				
129/Ola.Wt.9				
129/Ola.Wt.10				
129/Ola.Wt.11				

Supplementary Table 3: Description of seizure level reached by each 129/Ola-Wt mouse plotted in Figure 1a.

SUPPLEMENTARY TABLE 4

Animal Code	Seizure Intensity Reached			
	Grade I-IV	Grade V	Grade VI	Death
129/Ola.Ko.1				
129/Ola.Ko.2				
129/Ola.Ko.3				
129/Ola.Ko.4				
129/Ola.Ko.5				
129/Ola.Ko.6				
129/Ola.Ko.7				
129/Ola.Ko.8				
129/Ola.Ko.9				

Supplementary Table 4: Description of seizure level reached by each 129/Ola-Ko

mouse plotted in Figure 1a.

SUPPLEMENTARY TABLE 5

Animal Code	Seizure Intensity Reached			
	Grade I-IV	Grade V	Grade VI	Death
FvB/N.Wt.1				
FvB/N.Wt.2				
FvB/N.Wt.3				
FvB/N.Wt.4				
FvB/N.Wt.5				
FvB/N.Wt.6				
FvB/N.Wt.7				
FvB/N.Wt.8				

Supplementary Table 5: Description of seizure level reached by each FvB/N-Wt mouse

plotted in Figure 1a.

SUPPLEMENTARY TABLE 6

Animal Code	Seizure Intensity Reached			
	Grade I-IV	Grade V	Grade VI	Death
FvB/N.Ko.1				
FvB/N.Ko.2				
FvB/N.Ko.3				
FvB/N.Ko.4				
FvB/N.Ko.5				
FvB/N.Ko.6				
FvB/N.Ko.7				

Supplementary Table 6: Description of seizure level reached by each FvB/N-Ko mouse

plotted in Figure 1a.

Alteracions en el comportament, dèficits d'aprenentatge i una elevada excitabilitat hipocàmica en el ratolí genoanul·lat per la PrP^C

Andreu Matamoros-Angles, Arnau Hervera, Jordi Soriano, Eulàlia Martí, Franc Llorens, Mario Nuvolone, Adriano Aguzzi, Agnès Gruart, José M. Delgado-García i José A. del Río

* Aquesta publicació està en preparació

Resum

El plegament anòmal de la proteïna priònica cel·lular (PrP^C) és l'agent causant de les Prionopaties. S'ha relacionat amb nombrosos processos cel·lulars com la neurotransmissió, la diferenciació cel·lular i la neuroprotecció. Els nivells de PrP^C disminueixen en les Prionopaties, i per tant, s'ha planejat la seva pèrdua de funció com a part de la patologia. Recentment, s'ha demostrat que els models animals genoanul·lats per la PrP^C (*Prnp*^{0/0}) presenten artefactes generats durant la transgènesi emascarant els resultats que se'n derivaven. En aquest treball, utilitzem el nou model deficient per la PrP^C (*Prnp*^{0/0}), el ZH3, per esclarir el paper d'aquesta proteïna en la neurotransmissió hipocàmica, en la maduració neuronal i en la conducta. Els nostres resultats mostren un comportament ansiós, una activitat reduïda i un deteriorament de l'aprenentatge basat en el condicionament operant en els animals ZH3-*Prnp*^{0/0}. L'absència de PrP^C també provoca una elevada excitabilitat sinàptica, una major susceptibilitat epilèptica i impossibilita la generació de potenciació a llarg termini (LTP). Els nostres resultats *in vitro* mostren un retard en la formació de xarxes i una baixa connectivitat.

Behavioral deficits, learning impairment, and enhanced hippocampal excitability in prion protein knock-out mice

Matamoros-Angles, A.^{1,2,3,4} ; Hervera, A.^{1,2,3,4} ; Soriano, J.^{5,6} ; Martí, E.^{7,8} ; Llorens, F.^{3,9,10} ; Nuvolone, M.^{11,12} ; Aguzzi, A.¹¹ ; Gruart, A.¹³ ; #Delgado-García, JM.¹³ ; #del Río, JA.^{1,2,3,4}

AFFILIATIONS

[1] Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute of Bioengineering of Catalonia (IBEC), Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain.

[2] Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

[3] Ministry of Economy and Competitiveness, CIBERNED (Network Centre of Biomedical Research of Neurodegenerative Diseases), Institute of Health Carlos III, Barcelona, Spain.

[4] Institute of Neuroscience, University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain.

[5] Departament de Física de la Matèria Condensada, University of Barcelona, Catalonia, Spain.

[6] Institute of Complex Systems (UBICS), University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain.

[7] Department of Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain.

[8] Bioinformatics and Genomics, Center for Genomic Regulation, Barcelona, Catalonia, Spain.

[9] Department of Neurology, University Medical School, Göttingen, Germany

[10] Bellvitge Biomedical Research Institute (IDBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia Spain.

[11] Institute of Neuropathology, University Hospital of Zurich, Zürich, Switzerland

[12] Amyloidosis Center, Foundation IRCCS Policlinico San Matteo, Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy.

[13] Division of Neurosciences, University Pablo de Olavide, Seville, Spain.

ABSTRACT

Misfolded cellular prion protein (PrP^C) is the causative agent of the transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). PrP^C is a synaptic protein expressed in the cerebral cortex including the hippocampus. It has been described in numerous cellular processes (i.e. cell differentiation, neurotransmission, and copper homeostasis among others). Moreover, PrP^C levels are decreased in TSEs. These findings offer new insight into the study of TSEs: understanding this pathology also as a loss of function due to the reduction of PrP^C. Recently, it was demonstrated that many of the functions related to PrP^C were based on mouse models with impure background, and these need to be reevaluated.

Here we elucidate the role of PrP^C in hippocampal circuitry and in its derived functions (i.e. learning and memory) using a new co-isogenic *Prnp*^{0/0} mouse, the ZH3 model. Open field and operant conditioning tests were performed to evaluate memory and learning capabilities. Input-output curves, paired-pulse facilitation and long-term potentiation (LTP) were determined in the hippocampal Schaffer collaterals in behaving animals. Finally, spontaneous firing and network formation were monitored with calcium imaging in neuronal primary cultures during culture maturation.

Our results showed increased motility, impaired operant conditioning learning, and anxiety-related behavior in ZH3-*Prnp*^{0/0} animals. PrP^C absence enhanced the susceptibility to high intensity stimulations and kainate-induced seizures in mouse hippocampus. Interestingly, LTP was not induced in *Prnp*^{0/0} Schaffer collaterals. *In vitro* calcium imaging showed a delay in neuronal maturation and network formation.

PrP^C mediates synaptic function and protects from excitotoxic insults. Its deletion occurred in an epileptogenic brain that failed to perform highly cognitive-demanding tasks such as associative learning, producing anxiety-like behavior.

INTRODUCTION

Cellular prion protein (PrP^C) is an extracellular membrane protein mainly expressed in the central nervous system encoded by *Prnp* gene (Aguzzi and Polymenidou, 2004). PrP^C was discovered as the causative agent of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) (Prusiner, 1982). In TSEs, PrP^C suffers abnormal post-translational processing, generating a pathogenic scrapie conformation (PrP^{Sc}). Over time, PrP^{Sc} accumulates in the brain, causing neuronal death, reactive gliosis, and inflammation. TSE patients display a rapidly progressive dementia that leads to death 1-2 years after onset (Takada et al., 2018).

PrP^C has been well studied but its physiological function remains partially unknown and controversial (Wulf et al., 2017; Watts et al., 2018). To date, there are numerous studies describing roles for PrP^C in copper homeostasis (Vassallo and Herms, 2003), neurotransmission (Maglio et al., 2004; Khosravani et al., 2008), neuronal differentiation (Steele et al., 2006), peripheral myelin maintenance (Kuffer et al., 2016), and neuroprotection (Walz et al., 1999). This wide range of functions, as well as the reduction of PrP^C expression in the neuronal parenchyma of TSE patients (Llorens et al., 2013), provided a new understanding of TSEs: the cause of neurological deterioration in these patients is not only due to the PrP^{Sc} accumulation, but also to the loss of the PrP^C physiological function upon its transformation to the scrapie form (Leighton and Allison, 2016). Therefore, the study of the physiological function of PrP^C in *Prnp*^{0/0} animal models can provide insights into TSE pathology and its drastic symptomatology.

Several studies have explored the physiological roles of PrP^C in knock-out mouse models; however the obtained data became controversial some years ago (Nuvolone et al., 2013). It was demonstrated that some physiological functions were misattributed to PrP^C due to artifacts from the transgenesis procedure of the most commonly used model, ZH1-*Prnp*^{0/0} mice (Büeler et al., 1992). It was demonstrated that PrP^C-dependent phagocytosis regulation was due to *Sirpa* polymorphism differences between *Prnp*^{0/0} and *Prnp*^{+/+} mice instead of PrP^C expression. 129Sv background embryonic cells were implanted in a C57BL6 female causing differences in the polymorphism expressed by the genes surrounding *Prnp* deletion, the so-called Flanking genes, in *Prnp*^{0/0} mice but not in the wild-type littermates (de Almeida et al., 2005; Nuvolone et al., 2013). Since then, all the physiological functions attributed to PrP^C have been brought into question and need to be reevaluated. Our group

demonstrated that this phenomenon also affected the neuroprotective function of PrP^C in kainate-induced excitotoxicity in ZHI mice (Carulla et al., 2015).

The detailed study of PrP^C localization uncovered its enrichment in the excitatory synaptic terminal where it has been related to glutamate receptors (NMDA-R, GluK2 and mGluR5) and anchoring proteins such as PSD-95 (Khosravani et al., 2008; Carulla et al., 2011; Ferreira et al., 2017). However, the real implication of PrP^C in neurotransmission remains unclear and controversial. Different results have reported the role of PrP^C in long-term potentiation (LTP). It has been observed that *Prnp*^{0/0} mice display reduced (Collinge et al., 1994; Manson et al., 1995; Criado et al., 2005), normal (Lledo et al., 1996), and enhanced LTP (Rangel et al., 2009). Following this observations, the real consequences of PrP^C ablation in memory, learning, and behavior are also unclear (Büeler et al., 1992; Criado et al., 2005).

In the present study, we focused on the PrP^C function in LTP, learning, and memory, taking advantage of the recently generated ZH3-*Prnp*^{0/0} mouse model. It was generated in a pure background (C57BL6) by minimally altering the genome (Nuvolone et al., 2016). Here we performed a set of behavior tests to analyze ZH3-*Prnp*^{0/0} mouse activity, learning, and memory capabilities. Synaptic facilitation, excitability, and LTP induction were evaluated electrophysiologically in the ZH3-*Prnp*^{0/0} hippocampus in behaving mice. Finally, neuronal differentiation and bursting were evaluated in cortical neural *Prnp*^{0/0} cultures.

ZH3-*Prnp*^{0/0} mice display reduced motility and anxiety-like behavior. They also fail to acquire instrumental learning in the Skinner Box Test. Our electrophysiological experiments show *Prnp*^{0/0} synapse cannot induce LTP may be due to an exacerbated excitability, even leading to epileptic seizures. Accordingly, *Prnp*^{0/0} mice are more susceptible to kainate-induced epilepsy. Finally, in vitro calcium imaging shows that the absence of PrP^C causes a delay in neuronal network maturation and a reduction of bursting.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult C57Bl6 mice (*Prnp^{+/+}*) were purchased from Charles River Laboratories (Les Oncins, France). *Prnp^{0/0}* mice (ZH3 model described in Nuvolone et al., 2016) were provided by Prof. Adriano Aguzzi (Institute of Neuropathology, University Hospital of Zurich, Zürich, Switzerland). It is a constitutive knock-out mice. A total of 136 adult (3-5 months old) male mice (*Prnp^{+/+}* = 67 and *Prnp^{0/0}* = 69) were used in the present study. All experiments were performed following the protocols and guidelines of the Ethical Committee for Animal Experimentation (CEEAA) of the University of Barcelona. CEEAA of the University of Barcelona approved the protocol for the use of animals in this study (CEEAA approval #276/16 and 141/15).

Behavioral Studies

All the behavioral experiments were carried on in the laboratory of Prof. José María Delgado-García and Dr. Agnès Gruart (Division of Neurosciences, Pablo de Olavide University, Seville, Spain). A total of 98 animals were used in these sets of experiments (*Prnp^{+/+}* = 49 and *Prnp^{0/0}* = 49). Mice were housed alone on a 12/12-hour light/dark cycle with constant ambient temperature (21°C). Water and food were provided *ad libitum* except for the Instrumental Learning Test.

Open field test

Mice (*Prnp^{+/+}* = 49 and *Prnp^{0/0}* = 49) were placed in a MUX_XYZ16L Actimeter system (SMART, Panlab S.L., Barcelona, Spain) for 15 minutes on two consecutive days. The first day was a training session to reduce mouse anxiety; data presented were obtained from the second session. The arena had a grid (16 x 16) of infrared lasers on the XY axis and one on the Z axis. The system inferred mouse activity by counting laser intersections. The arena and the objects were cleaned with soap and ethanol between trials to remove olfactory cues.

The central square of the arena (10x10) was considered as the central zone and the rest as the peripheral zone for anxiety-related behavior measurement. It was considered that a mouse spent time in one of the regions if it remained there at least 3 seconds, to separate motility from exploratory behavior. Rearing episodes were considered when the animal stood up for at least 3 seconds and immobility episodes if it was immobile for 3 seconds.

The sum of the crossed X and the Y axes is presented together to show total mouse mobility. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean. The statistical analysis was performed with T-test or Mann-Whitney non-parametric test (GraphPad Prism 6 software). The asterisks indicate significant differences: $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$.

Skinner box test

The instrumental learning test in the Skinner box was performed as described (Madronal et al., 2010). Six Skinner boxes were used simultaneously (12.5x13.5x18.5 cm; MED Associates, St. Albans, VT, USA). Each Skinner box was housed in a sound-attenuating cubicle (90x55x60 cm) constantly exposed to white noise (45 dB) and soft light (Cibertec, S.A, Madrid, Spain). The boxes had a trough to receive food pellets (Noyes formula P; 45 mg; Sandown Scientific, Hampton, UK) by pressing a lever. Mouse food availability was monitored for seven days before the test in order to reduce initial weight by 85%.

First, the animals ($Prnp^{+/+} = 49$ and $Prnp^{0/0} = 49$) were trained to press the lever to receive food pellets in a fixed-ratio 1:1. Seven daily sessions (20 min) were held. The boxes were cleaned with soap and ethanol (30%) between trials. Obtaining ≥ 20 pellets for two consecutive sessions was defined as the threshold to assume achievement of learning criteria.

After this first evaluation of operant conditioning, we increased the paradigm complexity to test our mice in a more demanding cognitive task for 10 days. Half of the animals that met learning criteria were tested ($Prnp^{+/+} = 24$ and $Prnp^{0/0} = 20$). The paradigm consisted of light (ON period) and dark periods (OFF period) randomly distributed during the session. The lever pulses during the light period (20 s) were reinforced with food pellets at a ratio 1:1. The pulses during the dark period were not rewarded and were penalized by adding 10 more seconds (20 s \pm 10 s). The number of lever presses and the different conditioning paradigms were monitored and recorded with the MED-PC program (MED Associates, St. Albans, VT, USA).

The statistical analysis was carried out using Anova 2-factors with sessions as repeated measures and Bonferroni's multiple comparisons test (GraphPad Prism 6 software). The asterisks indicate significant differences: $**p < 0.01$; and $***p < 0.001$. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean or as a percentage (indicated in each figure axis).

Object recognition test

The object recognition test was performed in a homemade arena (30 x 25 x 20 cm) as described (Clarke et al., 2010). A total of 46 mice were tested ($Prnp^{+/+} = 23$ and $Prnp^{0/0} = 24$). The test consisted of four phases of 10 minutes each. First, animals were habituated to the arena without any object. One hour later, two identical plastic objects were placed in the center of the arena for the training session. Short-term memory test was performed 2-3 hours later changing one of the objects. Finally, 24 hours later, the new object was changed to another unknown object for the long-term memory test.

The arena and the objects were cleaned with soap and ethanol between trials to remove olfactory cues. Mouse behavior was recorded with a video camera situated over the arena. The exploratory behavior was measured, blinded, with the video recordings. Sniffing and gently touching the objects were counted as exploratory behavior, but climbing and gnawing the object were not. Fecal bodies were counted as an indicator of stressed behavior during the habituation session. The statistical analysis was performed with Mann-Whitney non-parametric test (GraphPad Prism 6 software). The asterisks indicate significant differences: $***p < 0.001$. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean or as a percentage (indicated in each figure axis).

Surgery

A total of 98 adult male mice were operated on ($Prnp^{+/+} = 49$ and $Prnp^{0/0} = 49$). Four of them died during surgery and 33 were excluded because inability of obtaining a reliable recording. In the end, the experiments were performed with 61 mice ($Prnp^{+/+} = 31$ and $Prnp^{0/0} = 30$).

Surgery was performed as described (Rangel et al., 2009; Medrano-Fernandez et al., 2018). Mice were deeply anesthetized with ketamine (35 mg/kg) and xylazine (2 mg/kg) i.p. Electrodes were put in the right dorsal hippocampus (Fig. 3A). Two recording electrodes were implanted in the *stratum radiatum* of the CA1 area (1.2 mm lateral to and 2.2 mm posterior to Bregma; 1.3 mm under the cranium), and two stimulating electrodes were implanted in the Schaffer collateral pathway in the CA3 region (2 mm lateral to and 1.5 mm

posterior to Bregma; 1.3 mm under the cranium). Electrodes were homemade with 50 μm Teflon-coated tungsten wires (Advent Research, Eynsham, UK). The electrode localizations were checked according to the field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) profile evoked by a single stimulation. A silver wire was fixed to the cranium as ground. All the wires were soldered to a six-pin socket (RS Amidata, Madrid, Spain) fixed to the skull with dental cement. Recordings started from a minimum of one week after the surgery.

Electrophysiology recordings

Six animals were recorded at the same time. Each animal was placed in a small plastic cubicle (5x5x10 cm) in a larger Faraday box (30x30x20 cm). fEPSPs were recorded with a high impedance probe ($2 \times 10^{12} \Omega$, 10 pF) using differential amplifications at a bandwidth of 0.1 Hz-10 kHz (P511, Grass-Telefactor, West Warwick, RI, USA). For each experiment, artefactual recordings were discarded.

The stimulation intensity threshold of each animal was set with paired-pulse stimulations at 40 ms of inter-stimulus interval. The intensity was set to 40-60% of the amount necessary to evoke a suturing response. These intensity values were used for all the experiments.

Paired-pulse stimulation

For synaptic facilitation experiments, 51 mice ($Prnp^{+/+} = 27$ and $Prnp^{0/0} = 24$) were stimulated at Schaffer collaterals with two pulses at different inter-stimulus intervals (10, 20, 40, 100, 200, and 500 ms) at threshold intensities previously defined for each mouse. In all the intervals, the stimulations were repeated 10 times. Data are presented as the mean of percentage increases of fEPSP2 from fEPSP1 ($\text{fEPSP2} / \text{fEPSP1} \times 100$) \pm standard error of the mean.

Input/output curves

Schaffer collaterals of 29 mice ($Prnp^{+/+} = 14$ and $Prnp^{0/0} = 15$) were stimulated with paired pulses at 20 increasing intensities (0.02 to 0.04 mA increased by 0.02 mA each step) at 40 ms of inter-stimulus interval. In all the intensities, the stimulations were repeated 10 times. Data are presented as the mean of the fEPSP slope (V /s) \pm standard error of the mean.

The same data are presented as the mean of paired-pulsed ratio (PP ratio) \pm standard error of the mean. PP ratio is the percentage of the increase of the fEPSP2 from fEPSP1 (fEPSP2 / fEPSP1 \times 100). The area under the curve (AUC) was calculated from PP ratio of all the animals using GraphPad Prism 6 software. The statistical analysis was performed using Mann-Whitney non-parametric test or Anova 2-factors with sessions as repeated measures and Bonferroni's multiple comparisons test (GraphPad Prism 6 software). The asterisks indicate significant differences: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$.

Long-term potentiation

First, fEPSP baseline values were recorded for 15 minutes with paired-pulse stimulus every 20 seconds (40 ms inter-stimulus). Next, long-term potentiation (LTP) was evoked with a high frequency stimulation (HFS) protocol. HFS consisted of five trains of pulses at a rate of 1/s (200 Hz, 100 ms) with the same intensity as the baseline recording. The HFS was repeated six times at intervals of 1 minute. After the HFS protocol, the fEPSP slopes were recorded as baseline for one hour. The following four days, the recordings were repeated for 30 minutes.

Data are presented as the mean of the percentage compared to the baseline \pm standard error of the mean. The statistical analysis was performed using Anova 2-factors with sessions as repeated measures and Bonferroni's multiple comparisons test (GraphPad Prism 6 software). The asterisks and the number signs indicate significant differences: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$; ## $p < 0.01$; and ### $p < 0.001$.

Electrophysiology data analysis

fEPSPs and 1 V rectangular pulses corresponding to stimulus presentations were saved on a PC with an analog/digital converter (CED 1401 Plus, Cambridge, England). Data were analyzed off-line using Spike2 and Signal 5.04 software with home-made representation programs (Madrónal et al., 2009).

Kainate-induced epilepsy and seizure analysis

Adult (3-4 months old) male mice were used for these sets of experiments (*Prnp*^{+/+} = 18 and *Prnp*^{0/0} = 20) as described (Carulla et al., 2015). KA (Sigma, Darmstadt, Germany) solution was freshly prepared for each experiment in 0.1 M phosphate buffer. Mice were treated with 10 mg/kg of KA (b.w) three times: at 0 min, 30 min, and 60 minutes.

After the first injection, mice were placed in clean boxes (1-3 animals/box) and their epileptic behavior was monitored *in situ* and recorded with a video camera for 3 hours after administration. Seizure severity was scored in grades following the following criteria: grade I-II: hypoactivity and immobility; grade III-IV: hyperactivity and scratching; grade V: loss of balance control and intermittent convulsions; grade VI: continuous seizures and bouncing activity (also reported as blinking episodes or 'pop-corn' behavior). No mouse died during the experiment. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean or as a percentage (indicated in each figure axis). The statistical analysis was performed with Mann-Whitney non-parametric test (GraphPad Prism 6 software). The asterisk indicates significant differences: $*p < 0.05$.

FluoroJade B staining

Mice were perfused seven days after the kainate administration with phosphate buffered 4% paraformaldehyde (PFA) dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH = 7.3). Brains were extracted and fixed with PFA overnight. The following day, they were cryoprotected in 30% sucrose. Thirty-five μ m thick coronal sections were obtained with a frozen microtome (Leica, Wetzlar, Germany).

Sections containing dorsal hippocampus were rinsed in 0.1M phosphate buffer and mounted on gelatin-coated slides. The slides with the sections were dried at 37°C overnight. The following day, they were treated at 50 °C for 20 minutes one hour before the staining in order to improve adhesion. The staining started with pretreatment for 3 minutes in absolute alcohol, followed by 1 minute in 70% ethanol and 1 minute in deionized water. After that, they were oxidized in a solution of 0.06% KMnO₄ for 15 min. Following three rinses (2 min) in deionized water, they were incubated in a solution of 0.001% FluoroJade B (Chemicon, Temecula, CA, USA) containing 0.05% of DAPI in 0.1% acetic acid for 30 minutes. Finally, the slides were rinsed in deionised water (3 min), dried with decreasing dilutions of ethanol (from 70% to 100%), cleared with xylene, and cover-slipped with EukittTM (Merck, Darmstadt, Germany). Sections were examined using an Olympus BX61 epifluorescence microscope (Hamburg, Germany).

Primary cultures

Primary cortical cultures were obtained from E16-E17 *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} mouse embryos as explained (Urrea et al., 2018). Brains were removed from the skull and rinsed in cold 0.1 M phosphate buffer containing glucose (6.5 mg/ml). Cortical lobe pieces with the meninges removed were disaggregated with trypsin for 15 minutes at 37 °C. Horse serum was added afterwards as a trypsin inhibitor. Cells were isolated mechanically with pipette after treatment with 0.025% DNase for 10 minutes at 37 °C.

One million cells were plated on a 35 mm diameter glass-bottom culture dish gridded (Ibidi, Martinsried, Germany) previously coated with poly-D-lysine. Neurobasal medium supplemented with 6.5 mg/ml glucose, 2 mM glutamine, penicillin/streptomycin, 5% of horse serum, and B27 was used as culture medium. After 24 hours, the medium was replaced with the same medium supplemented with 2.5% horse serum. The medium was changed every other day. Horse serum was removed from the medium the eighth day of culturing.

Calcium imaging in neuronal culture

The cortical cultures were infected 24 hours after seeding with AAV-Syn_GCaMP6 (Chen et al., 2013) obtained from Addgene (Watertown, MA, USA). The cells started to express GFP reporter at 6-7 days in vitro (Div). Calcium imaging was recorded at 8, 11, 13, and 15 Div with an Olympus IX71 inverted microscope (Hamburg, Germany) equipped with an ORCA-Flash 4.0 camera (Hamamatsu Photonics, Shizuoka Pref., Japan). During recording, the cells were maintained in an incubator at 5% CO₂ and 37°C (Okolab S.R.L., Pozzuoli, Italy). The same region of the culture was recorded throughout the days following the culture dish grid. Photos were captured at 470 nm wavelength every 120 ms for 5 minutes.

Neuronal activity traces, spike events and network bursts

The recordings were analyzed offline using the MATLAB toolbox NETCAL (www.itsnetcal.com). First, a highly contrasted image of the average fluorescence of the recording was created, and regions of interest (ROIs) were automatically detected as those objects with a circular shape and whose brightness was over a preset threshold. About 400 ROIs, covering uniformly the field of view, were typically identified per recording. The average fluorescence $F_i(t)$ in each ROI i along the recording was then extracted, corrected

from global drifts and artifacts, and finally normalized as $(F_i(t) - F_{(0,i)}) / F_{(0,i)} = f_i(t)$, where $F_{0,i}$ is the background fluorescence of the ROI.

The time series of $f_i(t)$ were analyzed with NETCAL to infer the timing of neuronal activations using the Schmitt trigger method. This method scanned the fluorescence traces for events that first passed a high threshold and then remained elevated above a second lower threshold for at least a certain minimum duration. Shorter events were discarded. In our analysis we used +2 standard deviations (s.d.) of the mean of the baseline noise as the high threshold, +1.5 s.d. as the low threshold, and 200 ms as the minimum event length. Raster plots of network activity were then constructed by representing the trains of detected neuronal spikes along time.

Network bursts were analyzed to quantify the ability of the neuronal networks to exhibit coordinated dynamics, the collective activation of a group of neurons in a short time window. Burst were investigated using two approaches. Firstly, raster plots of spikes events were investigated to detect collective occurrences in which at least 5% of the neurons in the network fired synchronously. This threshold of 5% was set to disregard random activations. In the second approach, the fluorescence time series of all neurons in the network was averaged and the resulting trace analyzed with the Schmitt trigger method to detect sufficiently strong fluorescence peaks and that were associated with bursting episodes. Both approaches procured consistent results. Although the detected bursts contained different number of participating neurons, this information was disregarded in the present analysis and treated later. The total number of detected network bursts divided by the duration of the recording reflected the activity of the culture (indicated as bursts/min).

The fraction of active neurons in the network was calculated as follows. All detected ROIs were ascribed as neurons. After inferring the spikes trains, those neurons exhibiting at least 2 spikes along the recording were considered active, and their number N_A set as a proxy of the healthy population in the network. The average fraction of active neurons in each condition was then determined as $f = N_A/N_T$, where N_T the total number of detected ROIs.

10 videos of each genotype where analyzed. Data are presented as the mean of network burst/minute \pm standard error of the mean. The statistical analysis was performed using Anova 2-factors with Div as repeated measures and Bonferroni's multiple comparisons test (GraphPad Prism 6 software). The asterisks indicate significant differences between $Prnp^{+/+}$ and $Prnp^{0/0}$ culture at a given Div: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$. The number signs indicate significant differences between a given Div with the initial value at 8 Div: ### $p < 0.001$.

RESULTS

The absence of PrP^C has been related to deficiencies in behavior, learning, and memory in several mouse models (Criado et al., 2005; Gadotti et al., 2012). However, this is still controversial since other groups have reported no differences with control mice (Büeler et al., 1992; Salazar et al., 2017). This controversy may be explained by the different experimental procedures and, in particular, the comparison of mice with impure background such as the ZH1 model with the Flanking genes (Nuvolone et al., 2013). In order to evaluate the real implication of PrP^C in behavioral systemic tasks, we performed a battery of behavior tests with the new ZH3-*Prnp*^{0/0} mouse model (Nuvolone et al., 2016).

Reduced activity and anxiety-related behavior in *Prnp*^{0/0} mice

Firstly, we performed the open field test to measure mouse activity. *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} (n = 49 in both genotypes) mice were individually placed in the open field arena for 15 min and their activity was evaluated on the X, Y, and Z axes with a laser grid (Fig. 1A). *Prnp*^{0/0} mice moved significantly less in the field, showing reduced motility (*Prnp*^{+/+} = 3725 ± 93 a.u.; and *Prnp*^{0/0} = 3370 ± 95 a.u.; *p* = 0.009; *T-test*) (Fig. 1B).

Anxiety and stress aggravate the natural aversion of rodents to exploring exposed and unknown areas such as the center of the arena in the open field test. In order to evaluate anxiety-like behavior in *Prnp*^{0/0} mice, we monitored the time spent by the animals in the center and periphery of the arena. *Prnp*^{+/+} mice spent the same time in both sections, while *Prnp*^{0/0} animals remained significantly more time in the periphery area showing an anxiety-like behavior (*Prnp*^{+/+}: Center = 303.3 ± 14.5; Periphery = 345.7 ± 18.0; and *Prnp*^{0/0}: Center = 288.2 ± 15.1; Periphery = 394.3 ± 20.3; *p* = 0.071 and *p* < 0.0001 respectively; *T-test*) (Fig. 1C). Stressed behavior was also assessed by counting the number of rearing and immobility episodes. *Prnp*^{0/0} mice displayed significantly fewer rearing episodes (*Prnp*^{+/+} = 52 ± 2; and *Prnp*^{0/0} = 26.6 ± 1.7; *p* < 0.0001; *T-test*) and more immobility episodes (*Prnp*^{+/+} = 6.6 ± 1.2; and *Prnp*^{0/0} = 12.4 ± 0.9; *p* < 0.0001; Mann-Whitney test) showing deficient interaction with the environment and confirming the anxiety-like behavior (Fig. 1D).

***Prnp*^{0/0} mice failed instrumental learning task**

Our next goal was to check the capabilities of *Prnp*^{0/0} mice in performing highly demanding learning tasks. Instrumental learning capabilities were tested with operant conditioning in the Skinner box. The test was performed with 98 animals ($n = 49$ in both genotypes) and consisted of daily sessions (7 days, 20 minutes) in which the ability to learn that food pellet delivery was controlled by pushing a lever near the trough (Fig. 2A). *Prnp*^{+/+} mice pressed the lever significantly more times from session 3 than the *Prnp*^{0/0} animals (Session 3: *Prnp*^{+/+} = 40.2 ± 5.1 and *Prnp*^{0/0} = 23.3 ± 3.2 $p = 0.0023$; Session 4: *Prnp*^{+/+} = 53.0 ± 3.9 and *Prnp*^{0/0} = 29.4 ± 3.1 $p < 0.0001$; Session 5: *Prnp*^{+/+} = 55.1 ± 3.3 and *Prnp*^{0/0} = 36.1 ± 3.9 $p = 0.0003$; Session 6: *Prnp*^{+/+} = 70.5 ± 4.1 and *Prnp*^{0/0} = 38.3 ± 3.9 $p < 0.0001$; Session 7: *Prnp*^{+/+} = 59.9 ± 2.3 and *Prnp*^{0/0} = 39.6 ± 3.5 $p < 0.0001$; Bonferroni's multiple comparisons test, Anova 2-factors). Thirty-one percent of *Prnp*^{0/0} mice did not meet learning criterion (obtaining at least 20 pellets for two consecutive sessions) at the end of the training session. In contrast, 100% of the *Prnp*^{+/+} animals met the criteria from session 6 (Fig. 2B).

Prnp^{0/0} mice showed instrumental learning deficiencies. However, as we saw in the open field test, they displayed considerable inactivity behavior (Fig. 1). In order to distinguish the reduction of activity from true learning deficits, 44 mice (n : *Prnp*^{+/+} = 24 and *Prnp*^{0/0} = 20) were subjected to a more complex paradigm in the Skinner Test.

The animals were trained to push the lever only when a light bulb was switched on (ON period). If the lever was pressed when the bulb was switched off (OFF period), the animal did not receive the food pellet and, in addition, the switching on interval was delayed as a penalty. As we expected due to their increased motility, the total number of lever pulses in the OFF period was higher in the *Prnp*^{+/+} mice, drastically reduced during the sessions (Session 1 = 134.8 ± 13.3 ; Session 10 = 39.7 ± 5.2). In parallel, they increased the number of pulses in the ON period (Session 1 = 26.9 ± 1.8 ; Session 10 = 45.7 ± 2.8) (Fig. 2C). In contrast, *Prnp*^{0/0} individuals showed a reduced decrease of pulses in the OFF period (Session 1 = 73.2 ± 11.7 ; Session 10 = 26.5 ± 3.9) and an incipient increase in the ON period (Session 1 = 23.4 ± 1.6 ; Session 10 = 31.1 ± 2.9) (Fig. 2D). The learning capacity, measured as the difference in the curve slope during ON or OFF periods, was drastically reduced in *Prnp*^{0/0} mice (OFF: *Prnp*^{+/+} = -12.5 $R^2 = 0.90$; *Prnp*^{0/0} = -5.9 $R^2 = 0.92$; ON: *Prnp*^{+/+} = 2.3 $R^2 = 0.96$; *Prnp*^{0/0} = 0.8 $R^2 = 0.48$) (Figs. 2C, 2D). These differences show that *Prnp*^{0/0} mice failed to learn to avoid OFF periods and pushing the lever during the ON periods, indicating that PrP^C seems to be necessary for the full acquisition of instrumental learning goals.

Finally, episodic memory was evaluated with the object recognition test. Many *Prnp^{0/0}* mice were almost immobile during the test and interacted with the objects just for a few seconds (Fig. S1). Therefore, we discarded this approach because *Prnp^{0/0}* mice inactivity rendered the learning results unreliable. Importantly, *Prnp^{0/0}* mice defecated significantly more than the *Prnp^{+/+}* animals confirming the anxious behavior described with the open field test (Fig. S1).

Increased excitability in *Prnp^{0/0}* Schaffer collateral pathway

PrP^C has been described as a regulator of glutamate synapse and its excitability (Khosravani et al., 2008; Rangel et al., 2009). The glutamate system has primary responsibility for cognitive functions such as learning and memory. Therefore, we evaluated the consequences of PrP^C deletion in glutamate connectivity in *Prnp^{0/0}* mice in an effort to understand the cognitive and behavioral deficits we had observed. This question was addressed by studying the well-characterized Schaffer collateral pathway in the hippocampus. Stimulating and recording electrodes were permanently implanted in mice CA3 and CA1 regions, respectively (see Material and methods). This approach enabled us to measure the field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) generated in CA3-CA1 connection in behaving mice with different experimental approaches over the course of several days (Fig. 3A).

First of all, the synaptic facilitation evoked by the presentation of a pair of pulses in the CA3 region was evaluated. This is a presynaptic plastic phenomena of excitatory synapses related to increased neurotransmitter release. Paired-pulse facilitation was tested in *Prnp^{+/+}* (n = 27) and *Prnp^{0/0}* (n = 24) mice at different inter-stimulus intervals (10, 20, 50, 100, 200, and 500 ms). This approach generates a higher fEPSP from the second stimulus (fEPSP2) than the first (fEPSP1) at short intervals due to presynaptic facilitation. In our experiments, no differences were observed between *Prnp^{+/+}* and *Prnp^{0/0}* facilitation (Fig. 3B). These results suggest that PrP^C does not participate in presynaptic mechanism related to synaptic facilitation.

Our next goal was to analyze the consequences of PrP^C ablation in synaptic excitability. The slope of fEPSPs facilitation evoked by paired-pulse (40 ms inter-stimulus interval) stimulation was measured at increasing intensities (0.02 to 0.4 mA). In *Prnp^{+/+}* (n = 14) mice, fEPSP1 and fEPSP2 increased steadily more or less in parallel after 0.18 mA stimulation, reaching asymptotic values at 0.32 mA. fEPSP2 was significantly greater in three

stimulation intensities before arriving at the asymptotic values showing synaptic facilitation (0.24 mA: fESPS1 = 0.57 ± 0.1 V/s and fEPSP2 = 1.19 ± 0.2 V/s $p = 0.030$; 0.26 mA: fESPS1 = 0.70 ± 0.1 V/s and fEPSP2 = 1.32 ± 0.2 V/s $p = 0.031$; 0.24 mA: fESPS1 = 0.80 ± 0.1 V/s and fEPSP2 = 1.42 ± 0.2 V/s $p = 0.028$, Bonferroni's multiple comparisons test, Anova 2-factors). From 0.26 mA stimulation, fEPSP1 and fEPSP2 were statistically equal, so there was no synaptic facilitation at high intensities (Fig. 3C). This phenomenon has been described as a putative protective mechanism in high intensity insults to maintain hippocampal homeostasis (Madroñal et al., 2009). In contrast, in *Prnp^{0/0}* (n = 15) connection, fEPSP1 and fEPSP2 did not increase in parallel, showing exacerbated facilitation and suggesting the absence of this protective mechanism (Fig. 3D). EPSP2 was significantly greater than fEPSP1 at higher intensities (i.e.: 0.28 mA: fESPS1 = 0.4 ± 0.1 V/s and fEPSP2 = 1.09 ± 0.2 V/s $p = 0.010$; 0.32 mA: fESPS1 = 0.57 ± 0.1 V/s and fEPSP2 = 1.5 ± 0.3 V/s $p = 0.0002$; 0.36 mA: fESPS1 = 0.67 ± 0.1 V/s and fEPSP2 = 1.73 ± 0.3 V/s $p < 0.0001$; 0.40 mA: fESPS1 = 0.9 ± 0.2 V/s and fEPSP2 = 1.73 ± 0.4 V/s $p = 0.004$; Bonferroni's multiple comparisons test, Anova 2-factors). *Prnp^{+/+}* fEPSP1 increased steadily to greater asymptotic values than *Prnp^{0/0}* fEPSP1 (from 0.3 mA stimulation $\approx 50\%$ increased), but fEPSP2 were almost equal (fEPSP1: *Prnp^{+/+}* ≈ 1.0 V/s; *Prnp^{0/0}* ≈ 0.7 V/s and fEPSP2: *Prnp^{+/+}* ≈ 1.5 V/s; *Prnp^{0/0}* ≈ 1.6 V/s). Consequently, the increase in fEPSP1 related to fEPSP2 was around 50% in *Prnp^{+/+}* individuals, but more than 140% in their *Prnp^{0/0}* counterparts.

The exacerbation of synaptic facilitation was clearly observed with the paired-pulsed (PP) ratio (fEPSP2/fEPSP1 $\times 100$). At high intensities PP ratio was larger in the *Prnp^{0/0}* connection (Fig. 3E). The area under the curve (AUC) from 0.24 mA intensity was significantly lower in the *Prnp^{+/+}* (*Prnp^{+/+}* = 26.07 ± 4.0 a.u and *Prnp^{0/0}* = 40.75 ± 7.1 a.u $p = 0.04$; Mann-Whitney non-parametric test) (Fig. 3F). These results indicate that PrP^C regulates neuronal excitability and synaptic homeostasis at high intensity stimulations, playing a neuroprotective role.

High frequency stimulation generated epileptic crisis in *Prnp^{0/0}* Schaffer collateral pathway and failed to induce LTP

LTP is a form of synaptic potentiation related to learning and memory acquisition (Martin et al., 2000). PrP^C has been described as a regulator of NMDA receptors, the main post-synaptic players in LTP induction (Khosravani et al., 2008; Ferreira et al., 2017). Moreover, it was shown that *Prnp^{0/0}* mice had decreased LTP (Manson et al., 1995; Criado et al., 2005). However, others have found that *Prnp^{0/0}* mice had no alterations in LTP (Lledo et al.,

1996; Lauren et al., 2009). In order to redefine the function of PrP^C in LTP, we performed an LTP induction protocol based on high frequency stimulation (HFS) presentation to Schaffer collaterals of *Prnp*^{0/0} and *Prnp*^{+/+} mice (n= 20 both genotypes).

First, baseline signal was recorded for 15 minutes with a double pulse at an inter-stimulus of 40 ms. Afterwards, HFS was presented 6 times (1/min). This consisted of five trains (200 Hz, 100 ms) of pulses (1/s) (see Material and method for details). Recording were maintained for 60 minutes immediately after the HFS and repeated 30 minutes daily for 4 days from HFS presentation session.

Prnp^{+/+} connection displayed significant LTP for both pulses (Fig. 4A). fESPS1 and fESPS2 were significantly larger than the baseline after the HFS and this potentiation lasted for the 5 days of recording. As expected, HFS reduced paired-pulsed facilitation the first day due to excessive release of neurotransmitters in the first stimulation. From the second day, facilitation recovered steadily but with a range of increase from 350% to 150% with respect to fEPSP1 (i.e.: Baseline: fEPSP1= 100%; fEPSP2= 268.2 ± 43.1%; Day 1: fEPSP1= 478.3 ± 78.4 %; fEPSP2= 441.1 ± 140.2%; Day 3: fEPSP1= 310.4 ± 47.0%; fEPSP2= 466.3 ± 106.7%). In contrast, *Prnp*^{0/0} LTP induction was virtually nonexistent and paired-pulsed facilitation was maintained (≈ 60%) from the first day (i.e.: Baseline: fEPSP1= 100%; fEPSP2= 158.4 ± 23.0%; Day 1: fEPSP1= 153.43 ± 15.7%; fEPSP2= 224.3 ± 39.8%; Day 3: fEPSP1= 114.2 ± 11.9%; fEPSP2= 160.4 ± 23.8%) (Fig. 4B).

In addition, *Prnp*^{+/+} presented significantly larger fEPSP1 than *Prnp*^{0/0} (i.e.: Day 1: *Prnp*^{+/+} = 478.3 ± 78.3%; *Prnp*^{0/0} = 153.4 ± 15.7% $p < 0,0001$; Day 3: *Prnp*^{+/+} = 399.9 ± 65.0%; *Prnp*^{0/0} = 131.8 ± 12.3% $p = 0.0009$; Day 5: *Prnp*^{+/+} = 226.3 ± 29.4%; *Prnp*^{0/0} = 84.7 ± 8.0% $p = 0.034$; Bonferroni's multiple comparisons test, Anova 2-factors) (Fig. 4C). Following the same tendency, *Prnp*^{0/0} fEPSP2 was also smaller than *Prnp*^{+/+} fEPSP2 (i.e: Day 1: *Prnp*^{+/+} = 441.1 ± 140.2%; *Prnp*^{0/0} = 224.3 ± 39.8% $p = 0.008$; Day 3: *Prnp*^{+/+} = 466.3 ± 106.7%; *Prnp*^{0/0} = 181.4 ± 25.9% $p = 0,051$; Day 5: *Prnp*^{+/+} = 433.1 ± 87.7%; *Prnp*^{0/0} = 133.53 ± 18.0% $p = 0.06$; Bonferroni's multiple comparisons test, Anova 2-factors) (Fig. 4D). These results show that LTP increased fEPSPs in *Prnp*^{+/+} connection but not in *Prnp*^{0/0}.

Interestingly, *Prnp*^{0/0} Schaffer collaterals did not generate LTP. These results were surprising and were not in accordance with previous publications in which *Prnp*^{0/0} had even exacerbated LTP (Rangel et al., 2009). Trying to explain these results, we checked the *in situ* register in detail during HFS protocol (Fig. 4E). It was observed that 55% of the *Prnp*^{0/0} mice suffered from epileptic seizures due to HFS while just 20% of the *Prnp*^{+/+} did (Fig. 4F).

The *Prnp*^{0/0} epileptic crises tended to be longer (but not significantly) than those suffered by *Prnp*^{+/+} mice (*Prnp*^{+/+} = 12.08 ± 3.3 s; *Prnp*^{0/0} = 19.55 ± 2.5 s; $p = 0.12$; Mann-Whitney Test). We postulate that this exacerbated excitability in *Prnp*^{0/0} synapse impaired LTP generation. HFS may bring about an aberrant synaptic activation (even generating epileptic seizures) that enables activation of the molecular mechanisms needed for LTP induction. Therefore, as published with chemoconvulsants models (Walz et al., 1999; Carulla et al., 2015), PrP^C may exert a protection against electrical stimulation epilepsy.

Enhanced susceptibility to kainate-induced seizures in *Prnp*^{0/0} mice correlates with neuronal death in CA1-CA3 piramidal layers

Electrophysiological results from *Prnp*^{0/0} Schaffer collaterals point out a role of PrP^C regulating synaptic excitability and neuroprotection against electrical-driven epilepsy. PrP^C has also been reported, with some controversy, as a neuroprotector against chemoconvulsants such as PTZ and kainic acid (KA) (Striebel et al., 2013; Carulla et al., 2015). In order to confirm this phenotype, we performed an epilepsy induction protocol with KA in our ZH3-*Prnp*^{0/0} mouse model.

The administration protocol consisted of three injections of KA (10 mg/Kg body weight) at intervals of 30 minutes. Adult male *Prnp*^{+/+} (n=18) and *Prnp*^{0/0} (n=20) mice were treated. Mouse epileptic behavior was monitored for 3 hours after the first administration. Seizure and blinking episodes were counted. Each mouse epileptic phenotype was categorized in six stages according to its severity (see Materials and methods). Reaching at stage V implies having suffered at least one severe epileptic episode.

67% *Prnp*^{+/+} mice did not suffer any severe epileptic episode (stage I-IV). Only 22% and 11% arrived at stage V and VI respectively, displaying an epileptic phenotype. In contrast, 55% of *Prnp*^{0/0} mice suffered severe epileptic episodes: 20% arrived at stage V and 35% at stage VI (Fig. 5A and Supplementary movie 1). Moreover, *Prnp*^{0/0} mice presented more seizure and blinking episodes per animal than *Prnp*^{+/+} individuals (Seizure: *Prnp*^{+/+} = 1.06 ± 0.83; *Prnp*^{0/0} = 2.45 ± 0.74 $p = 0.019$; Blinking: *Prnp*^{+/+} = 0.22 ± 0.13; *Prnp*^{0/0} = 0.95 ± 0.29 $p = 0.069$; Mann Whitney test) (Fig. 5B).

CA3 and CA1 regions of hippocampus are the main target of the excitotoxicity damage driven by KA administration (Vincent and Mulle, 2009). In order to evaluate neuronal damage after KA-induced epilepsy, FluoroJade B staining was performed in treated-mouse

brain coronal sections (7 days after treatment). *Prnp*^{0/0} showed significant neuronal death in CA1 and CA3 pyramidal layers, while no signal was observed in *Prnp*^{+/+} sections (Fig. 5C).

These results demonstrate that the absence of PrP^C seems to generate an exacerbated synaptic excitability that increases the susceptibility to electrical and KA-induced seizures, even causing neuronal death in hippocampus.

Neuronal *Prnp*^{0/0}-derived cultures show reduced bursting and impairment in network formation

PrP^C has been described as a regulator of neurogenesis and neuronal differentiation in vitro and in vivo (Steele et al., 2006; Bribián et al., 2012). Moreover, defects in neuronal connectivity and maturation are related to epilepsy (Stafstrom and Carmant, 2015). Consequently, we tested whether *Prnp*^{0/0} increased excitability might come from alterations in neuronal differentiation that may cause aberrant connectivity and an immature neuronal network. To analyze the connectivity, calcium imaging was performed in cortical neural cultures (n= 10 in both genotypes) from *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} mouse embryos (E16-E17).

The day after the culture, primary cells were infected with adeno-associated virus carrying Syn_GCaMP6 construct (Chen et al., 2013). This protein allowed us to record calcium transients in neurons and infer neuronal activity. We recorded the same region after 8, 11, 13, and 15 days in vitro (Div) (see Materials and methods for details).

Prnp^{+/+} and *Prnp*^{0/0} cultures displayed the same number of collective bursts/min at 8 and 11 Div. After that, a delay in *Prnp*^{0/0} neuron maturation was observed compared with controls. *Prnp*^{+/+} cultures increased the number of bursts/min significantly at 13 Div; however *Prnp*^{0/0} cultures needed two days more, at 15 Div (Fig. 6A-B). Moreover, *Prnp*^{+/+} neurons performed significantly more bursts/min at 13 Div and 15 Div than *Prnp*^{0/0} ones showing a reduced firing interval (8 Div: *Prnp*^{+/+} = 0.62 ± 0.4 ; *Prnp*^{0/0} = 0.16 ± 0.1 ; 13 Div: *Prnp*^{+/+} = 4.86 ± 1.1 ; *Prnp*^{0/0} = 1.38 ± 0.4 $p < 0.001$; 15 Div: *Prnp*^{+/+} = 9.30 ± 0.7 ; *Prnp*^{0/0} = 5.46 ± 0.4 $p < 0.001$; Bonferroni's multiple comparisons test, Anova 2-factors). The *Prnp*^{0/0} cultures also showed a reduced size of the synchronous bursts (Fig. 6C). In the control culture around 80% of the neurons activated together at 11, 13 and 15 Div, while in the *Prnp*^{0/0} just around 50% did. These results show that collective bursting is reduced and delayed in *Prnp*^{0/0} culture, suggesting that PrP^C is necessary for network formation and maturation.

DISCUSSION

PrP^C has been related to several physiological functions using in vivo mouse approaches; however, the consequences of PrP^C deletion on behavior and cognition have not been extensively evaluated (Wulf et al., 2017). There are some published studies of *Prnp*^{0/0} mouse behavior, but PrP^C real function is still unclear. PrP^C participation in cognitive capabilities and behavior, as well as other functions related to PrPC, still remain obscure, especially after the description of the so-called Flanking genes in ZHI-*Prnp*^{0/0} model that masked specific PrP^C roles (Nuvolone et al., 2013). Here we assess the consequences of the absence of PrP^C in behavior and neurotransmission using the new pure ZH3-*Prnp*^{0/0} mouse model (Nuvolone et al., 2016).

ZH3-*Prnp*^{0/0} mice display reduced motility in the open field test. The reduced rearing exploration and peripheral predilection in the arena, and high defecation rate observed in *Prnp*^{0/0} mice, suggest an anxiety-like behavior that can explain their reduced motility. *Prnp*^{0/0} mice also failed to achieve instrumental learning in the Skinner box. Striking differences in motility between the wild-type and knock-out mice were appreciated using this approach, but learning capacity based on ON/OFF paradigm confirmed the deficiencies in operant conditioning, a type of associative learning. In accordance with our results, alterations in locomotor activity and increased latency to initiate exploration were previously reported in other *Prnp*^{0/0} mouse models (Coitinho et al., 2003; Criado et al., 2005). Anxiety-related behavior (Schmitz et al., 2014a), depressive tendencies (Gadotti et al., 2012), and alterations in spatial memory and learning have been also described (Criado et al., 2005; Schmitz et al., 2014b). In contrast, Bueler et al. reported no alterations in ZHI-*Prnp*^{0/0} behavior (Büeler et al., 1992). This disparity in results might be explained by the age of the animals used in the study. Bueler and collaborators performed the test with young animals (10-14 weeks) which could potentially uncover the behavior impairment as it was reported to be an age-dependent decline in other publications using ZHI model (Rial et al., 2009; Schmitz et al., 2014b). Another group also showed no deficits in *Prnp*^{0/0} mouse behavior. In that study, *Prnp* was conditionally deleted at 12 or 16 months and the results showed no alterations in Morris water maze or object recognition test (Salazar et al., 2017). Again, this was probably due to age-dependent factors. We reported behavioral deficits in *Prnp*^{0/0} mouse models with some discrepancies with the previous works, maybe related to age-related sampling and the background of the mice. We hypothesize that PrP^C regulates brain

development and neuronal connectivity, and therefore its absence impairs the integrity of neuronal circuitry in an age-related manner.

Glutamate neurotransmission is in large part responsible for cortical signaling, and its impairment has been related to behavioral deficits (Russo and Nestler, 2013). PrP^C has been described as a regulator of glutamate synapse (Watts et al., 2018). Even glutamate inhibition with a NMDA antagonist (MK-801) ameliorates depressive-like behavior in *Prnp*^{0/0} mice (Gadotti et al., 2012). Thus, our next step was to study glutamate connectivity to understand the behavior alterations. Schaffer collaterals of the hippocampus were evaluated as a well-defined model of glutamate circuitry and for their implication in operant conditioning, spatial learning, and anxiety-related behavior (Anacker and Hen, 2017).

Paired-pulse facilitation test did not show differences between *Prnp*^{0/0} and *Prnp*^{+/+} animals. Therefore, PrP^C deletion did not alter, at least in our model, synaptic facilitation. These results may be explained by the fact that synaptic facilitation is mainly a presynaptic phenomenon (Jackman and Regehr, 2017) and PrP^C has been related to post-synaptic neurotransmission mechanisms (Khosravani et al., 2008; Carulla et al., 2011).

However, *Prnp*^{0/0} Schaffer collaterals displayed increased excitability at high intensities in the input/output curves test, correlating with increased susceptibility to KA-induced seizures. This epileptogenic phenotype may explain our results on anxiety behavior in *Prnp*^{0/0} mice. Comorbid anxiety disorders affect patients with epilepsy (Kanner, 2011), and cognitive decline has been described in epileptic animal models (Medel-Matus et al., 2017). Moreover, increased excitability was previously reported, especially in susceptibility to KA, NMDA, and PTZ insults (Walz et al., 1999; Rangel et al., 2007). Aberrant lateral and collateral branching in the mossy fibers of the hippocampus, a phenotype characteristic of epileptic models, was reported in *Prnp*^{0/0} mice (Colling et al., 1997). Results suggesting a PrP^C role in the modulation of neuronal excitability has been clearly described: reduction after hyperpolarization potentials in *Prnp*^{0/0} hippocampal CA1 regions (Mallucci et al., 2002); PrP^C regulation of Ca²⁺ overloads after glutamate-agonist treatment in neurons in vitro (De Mario et al., 2017), and, a copper-dependent modulation of NMDAR complex to allosterically reduce glycine affinity (You et al., 2012).

Contradictory results were published by other groups, who described an elevated epileptic threshold in *Prnp*^{0/0} hippocampal slices treated with bicuculline, zero-magnesium conditions, and PTZ (Ratte et al., 2011), and also normal neurotransmission-associated parameters compared with wild-type mice (Lledo et al., 1996). Both studies recorded

hippocampal slices of FvB/N *Prnp*^{0/0} model, a mouse with a triple mixture background (FvB/129Sv/C57BL6) which carried the Flanking genes (Nuvolone et al., 2013). Distinct susceptibility to kainate-induced seizures among mice with different backgrounds has clearly been demonstrated; even the FvB model has been described as highly susceptible to epilepsy (Royle et al., 1999; McKhann et al., 2003). Furthermore, our group described the implication of genetic backgrounds and the Flanking genes to KA-induced epilepsy in different *Prnp*^{0/0} mouse models (Carulla et al., 2015). Our results using ZH3-*Prnp*^{0/0} animals in KA susceptibility were similar to those previously obtained with the other available *Prnp*^{0/0} co-isogenic mouse model, the 129/Ola (Carulla et al., 2015). Therefore, we postulate that these contradictory results published about the excitability of *Prnp*^{0/0} synapse may be explained by the mouse backgrounds, the Flanking genes effect, and the experimental approach; PrP^C indeed protects against KA-induced epilepsy.

Our results show that HFS causes epileptic seizures in the majority of *Prnp*^{0/0} mice and fails to generate significant LTP. Some controversial results have been published about the implication of PrP^C in LTP generation. Different experimental approaches (hippocampal slices or in vivo) and a mixture of mouse models with distinct backgrounds were used, generating non-comparable data (Collinge et al., 1994; Lledo et al., 1996; Criado et al., 2005; Rangel et al., 2009). Here we postulate that the absence of PrP^C results in LTP induction failure due to exacerbated synaptic excitability, although we cannot rule out a GABAergic disinhibition. It is well demonstrated that severe epileptic seizures cause neuronal death, which hampers LTP generation impossible. Moreover, non-severe epileptic seizures generate similar molecular and synaptic changes to LTP (Reid and Stewart, 1997; Meador, 2007). This suggests that non-severe HFS-induced seizures somehow saturate the post-synaptic terminal, over-activating LTP-induction mechanisms that reduce the capacity of LTP production by HFS. Additionally, PrP^C has also been related to key proteins required for LTP mechanism such as PSD-95 (Carulla et al., 2011) and AMPA and NMDA receptors (Khosravani et al., 2008; Watt et al., 2012; You et al., 2012; Ferreira et al., 2017).

The data presented showed that *Prnp*^{0/0} hippocampal synapse is highly excitable and epileptogenic. Epilepsy is caused by an imbalance between excitation and inhibition in the brain circuitry from both acquired and genetic factors. Alterations in brain connectivity due to developmental alterations, traumas, or infections constitutes one of the main causes of this imbalance (Stafstrom and Carmant, 2015). In order to assess whether the epileptic phenotype displayed by our *Prnp*^{0/0} animal came from neuronal connectivity alterations, we studied bursting and network formation in *Prnp*^{0/0}-derived neuronal cultures. We observed

that *Prnp*^{0/0} cultures did not mature and connect properly; they displayed asynchronous and very low bursting compared to wild-type cultures. These results indicate that the absence of PrP^C causes a delay in neuronal maturation and network formation. PrP^C was previously related to neuronal differentiation in vitro in neural precursors (Steele et al., 2006) and in neurons derived from TSE-derived iPSC (Matamoros-Angles et al., 2018), and in vivo in the hippocampus (Steele et al., 2006) and in the olfactory bulb (Parrie et al., 2018).

Increased knowledge of PrP^C roles in physiology will be critical for the understanding of TSE pathophysiology, beyond the misfolding and PrP^{Sc} accumulation. Our work characterizes for the first time the effects of *Prnp* deletion on behavior, learning, and neurotransmission in the ZH3 mice. The absence of PrP^C impairs neuronal network formation and connectivity, producing enhanced susceptibility to excitotoxicity insults such as HFS and KA exposure. This epileptogenic circuitry seems to impair highly cognitive-demanding functions such as associative learning, and yields anxiety-like behavior.

FIGURE 1

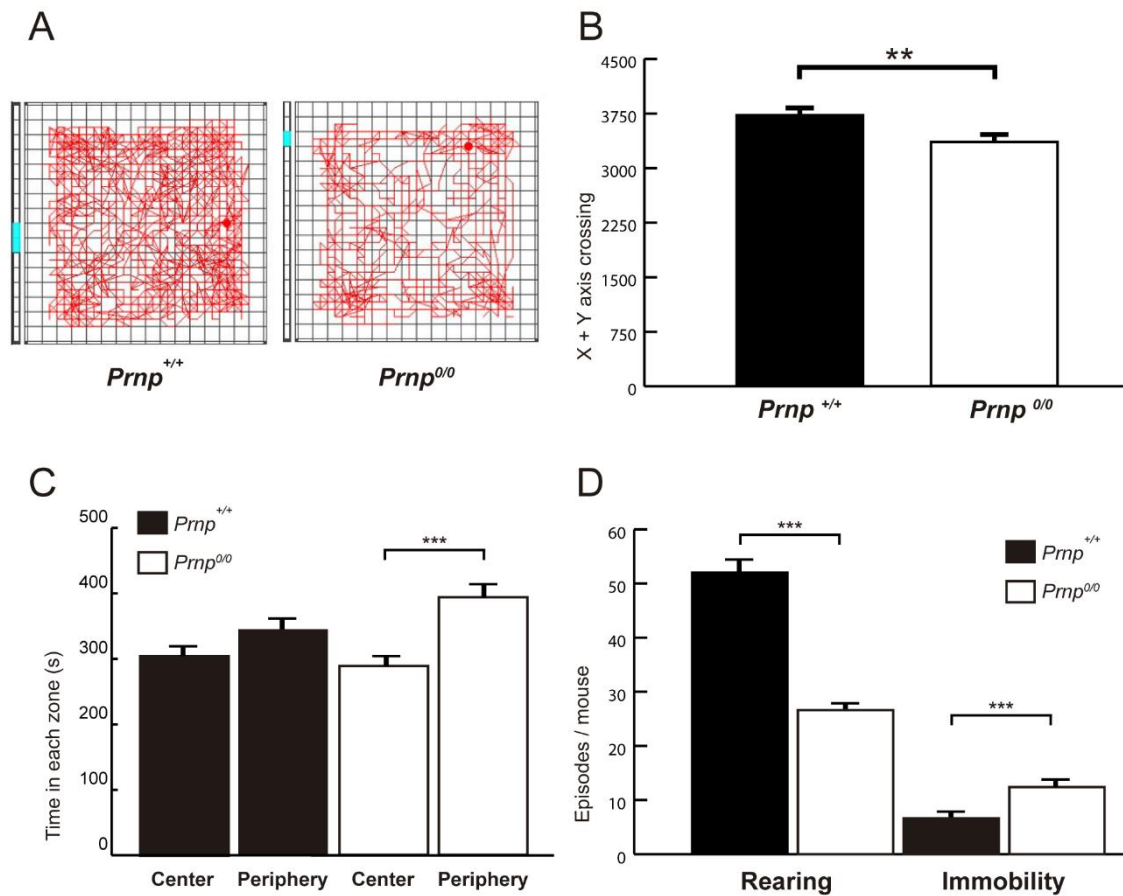


Figure 1. *Prnp*^{0/0} mice show reduced activity and anxiety-related behavior. **A**, Representative images of *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} mice exploring behavior in the open field test. **B**, Mice activity in the open field test as the sum of the movement in the X + Y axis. **C**, Time spent by the mice in the center and periphery of the open field arena. **D**, Number of rearing and immobility episodes displayed by *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} mice during open field test. Data are presented as mean ± SEM. ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 (T-test for **B** and Mann-Whitney non-parametric test for **C** and **D**).

FIGURE 2

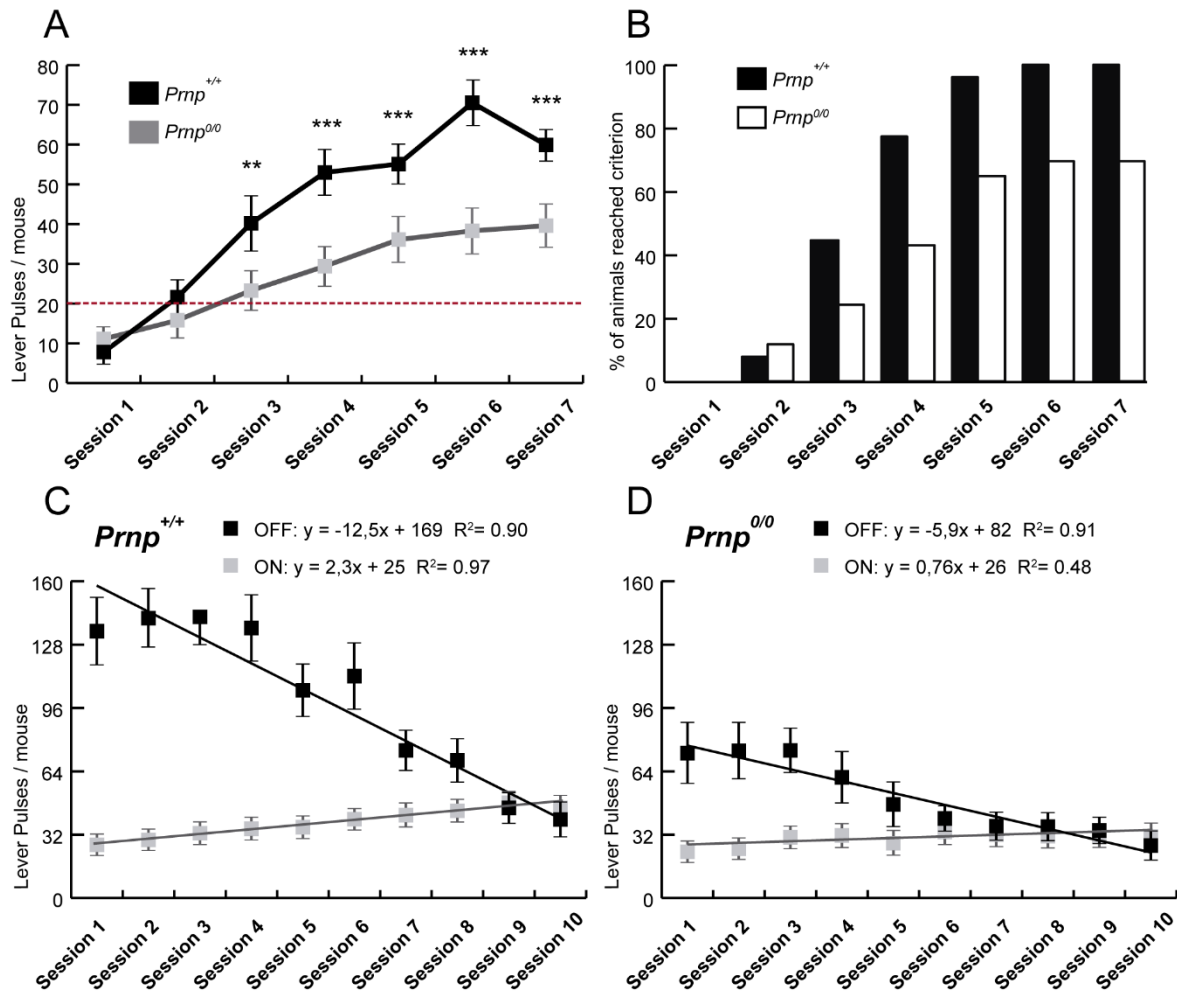


Figure 2. Impairment of instrumental learning with Skinner box test in *Prnp*^{0/0} mice. **A**, Lever pulses of *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} mice in the Skinner box in the 1:1 paradigm. The test was performed daily for 7 consecutive days. **B**, Percentage of mice reaching learning criteria (obtain at least 20 food pellets for two consecutive days) in each session of Skinner box test. **C**, **D**, Lever pulses of *Prnp*^{+/+} (**C**) and *Prnp*^{0/0} (**D**) mice in the Skinner box ON/OFF paradigm. The line shown are the linear tendency that best fit with the mean values of the ON (grey) or OFF (black) lever pulses. Tendency lines formulas are presented with their R^2 coefficient. Data are presented as Mean \pm SEM in **A**, **C** and **D**; and as percentage in **B**. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ (Anova 2-factors with sessions as repeated measures, Bonferroni's multiple comparisons test).

FIGURE 3

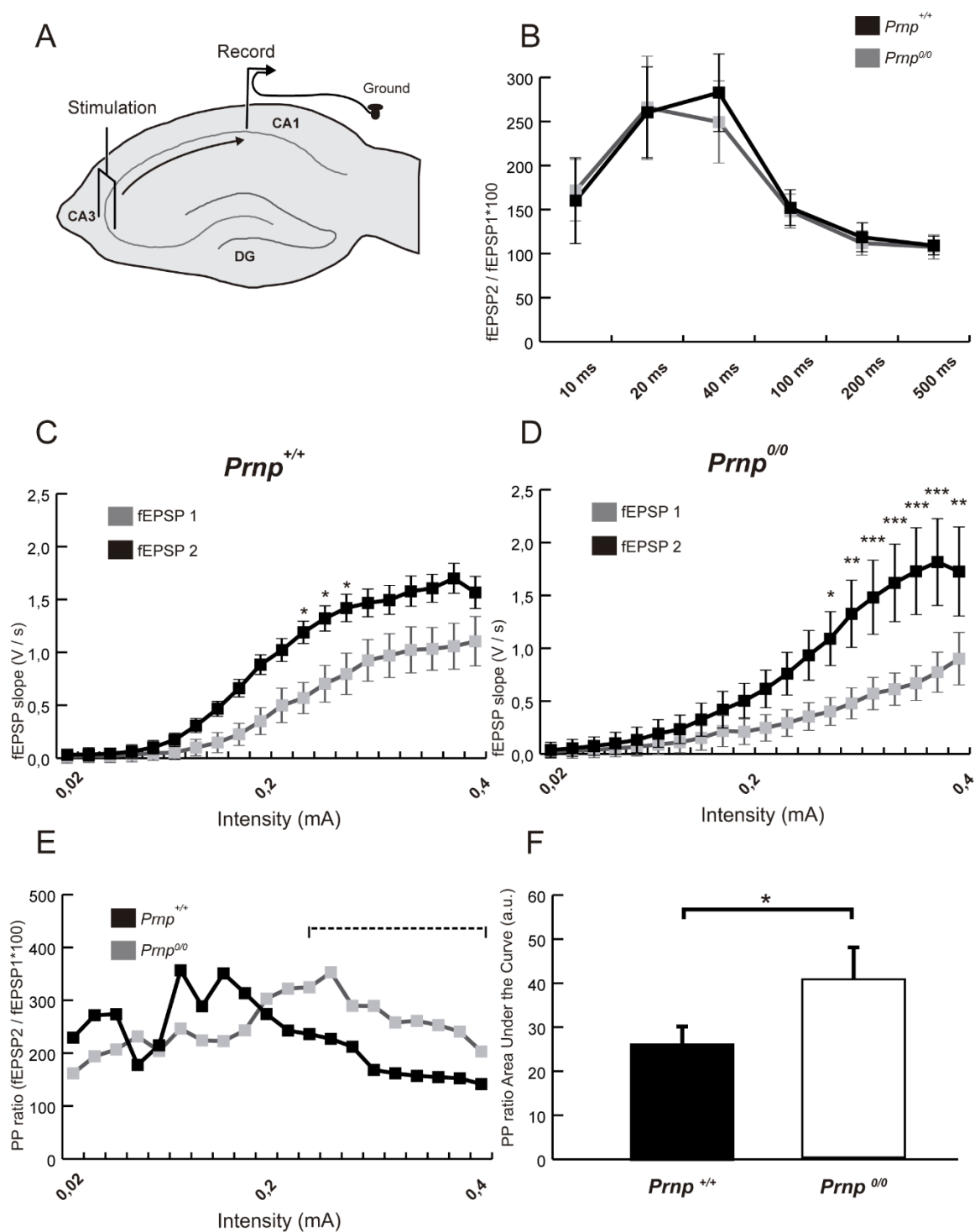


Figure 3. *Prnp^{0/0}* mice Schaffer collaterals show enhanced excitability. **A**, Schematic representation of electrodes implanted in mouse right dorsal hippocampus. Two stimulation electrodes are implanted in Schaffer collateral pathway in CA3 region and the recording ones in CA1 *stratum radiatum*. **B**, Effects of paired-pulse stimulation of the Schaffer collateral pathway after the presentation of different inter-stimulus frequency stimulations (10, 20, 40, 100, 200, 500 ms). Data are presented as the percentage of increase of fEPSP2 with respect to fEPSP1 (fEPSP2 / fEPSP1 * 100). **C**, **D**, Input/output curves of fEPSPs (V / s) in CA1 after the presentation of paired-pulse increasing intensity stimulus in CA3 area (0.02 mA to 0.4mA) of *Prnp^{+/+}* (**C**) and *Prnp^{0/0}* (**D**) mice. **E**, Paired pulse ratio (fEPSP2 / fEPSP1 * 100) of data in **C** and **D**. **F**, Area under the curve (a.u.) of PP ratio from 0.24 mA intensity. Data are presented as Mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ (Anova 2-factors with sessions as repeated measures, Bonferroni's multiple comparisons test for **C** and **D** and Mann-Whitney non-parametric test for **F**).

FIGURE 4

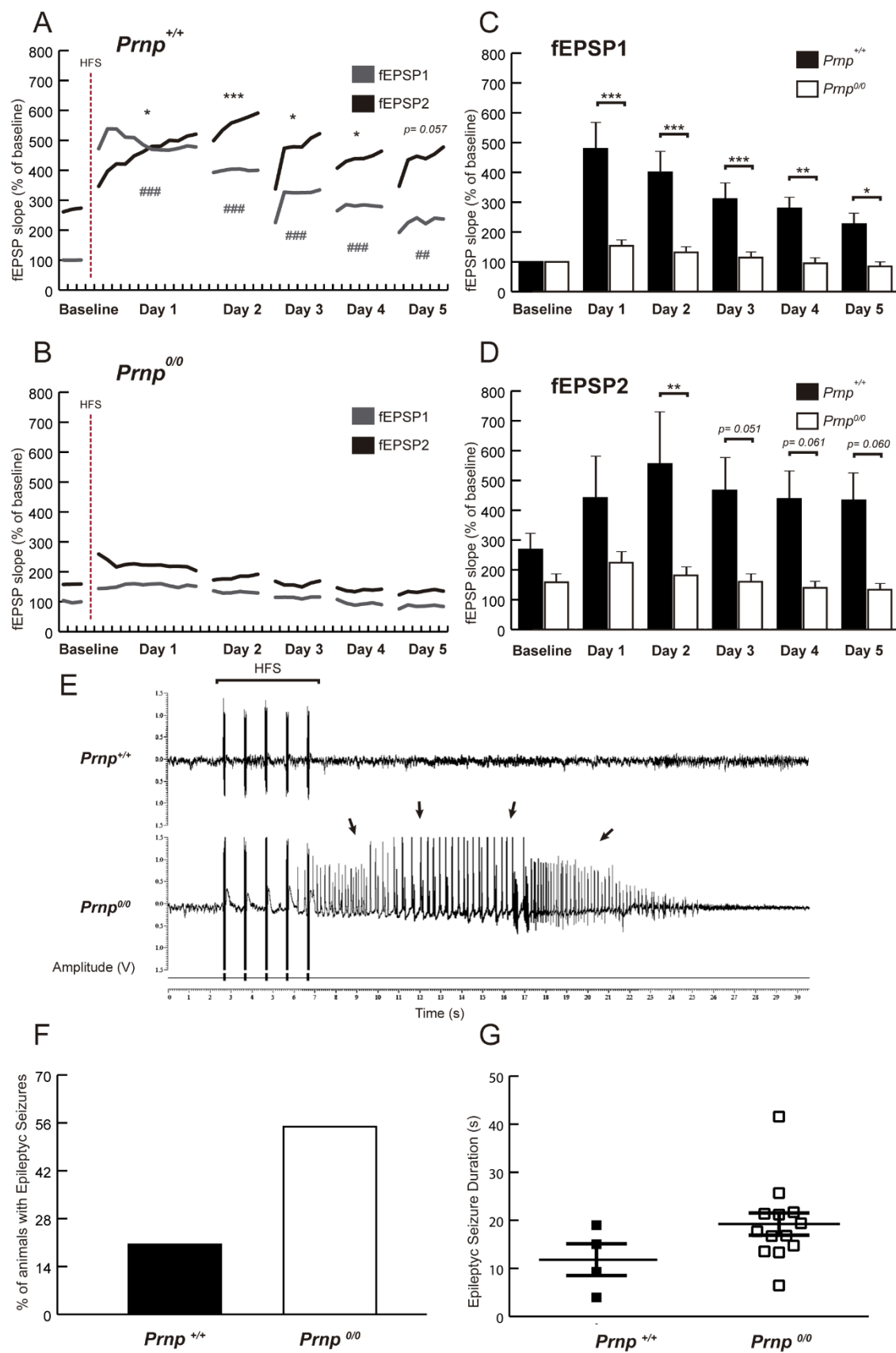


Figure 4. LTP is not induced in *Prnp^{0/0}* mice Schaffer collaterals and HFS presentation generates epileptic episodes. **A, B**, Evolution of fEPSP1 evoked in CA1 region by paired-pulsed stimulation of Schaffer collaterals for the *Prnp^{+/+}* (**A**) and *Prnp^{0/0}* (**B**) mice after HFS session. Data are presented as percentage of increase from baseline. Significant differences with baseline are presented in fEPSP1 (*) and fEPSP2 (#). **C, D**, *Prnp^{+/+}* (**C**), and *Prnp^{0/0}* (**D**) mice fEPSP slope mean before and after the HFS session. Data are presented as percentage of increase from baseline **E**, Example of register after HFS stimulation protocol in *Prnp^{+/+}* and *Prnp^{0/0}* Schaffer collaterals. Note the epileptic crisis in *Prnp^{0/0}* register. **F**, Percentage of mice who underwent epileptic crisis immediately after the HFS. **G**, Duration (s) of epileptic crisis after HFS. Data are presented as Mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ (Anova 2-factors with sessions as repeated measures, Bonferroni's multiple comparisons test).

FIGURE 5

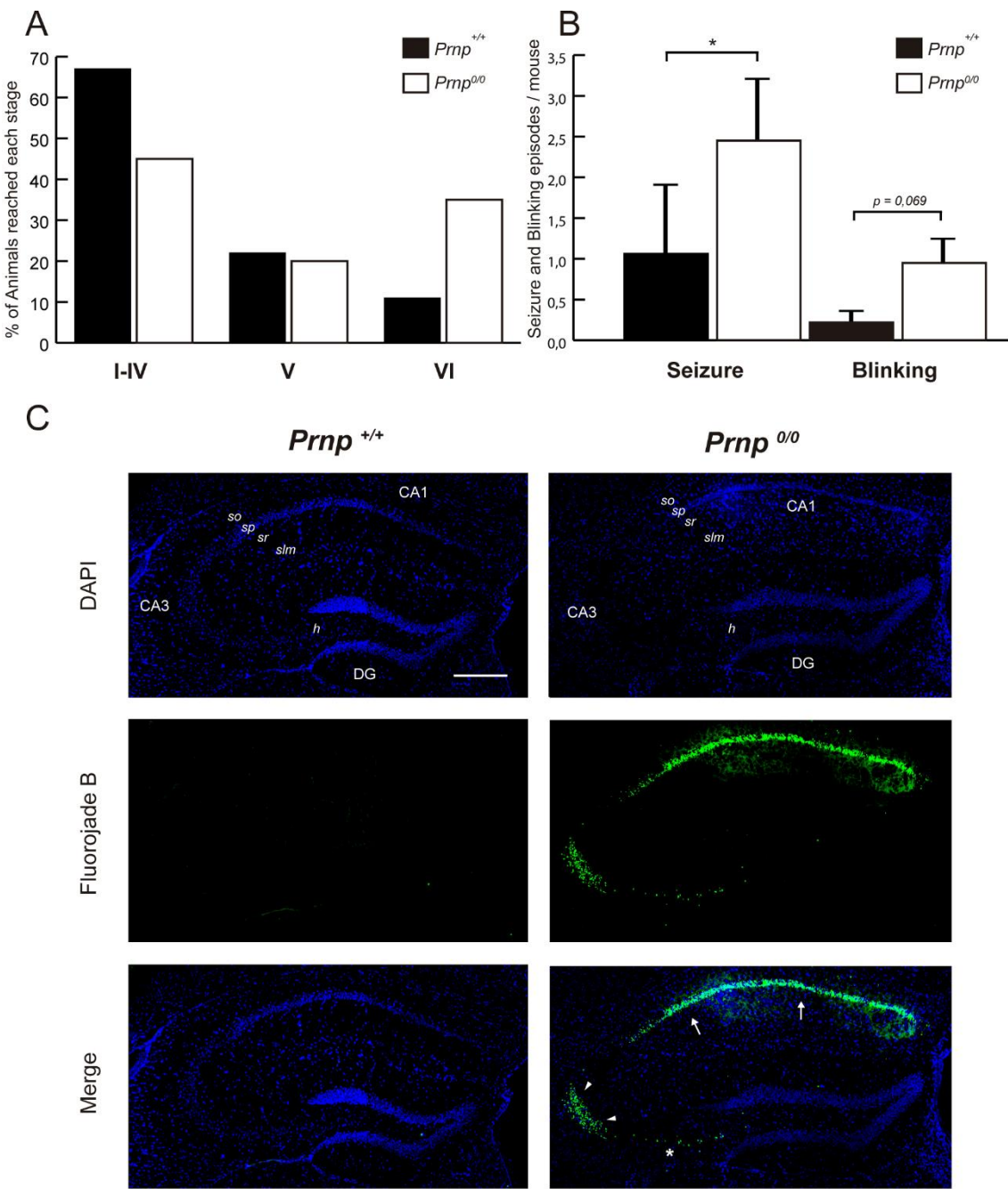


Figure 5. *Prnp*^{0/0} mice are more susceptible to kainate-induced epilepsy that correlates with neuronal death in CA1-CA3 pyramidal layers. **A**, Percentage of mice reaching stage I-IV, V, or VI epileptic phenotype after KA administration (10 mg/Kg). **B**, Number of seizures and blinking episodes suffered by *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} mice for 3 hours after KA administration. **C**, Photomicrographs showing the pattern of neurodegeneration with FluoroJade B staining 7 days after KA treatment in *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} mouse hippocampus. Nuclei are stained with DAPI. Dying cells (stained with Fluorojade B) are located in pyramidal cell layer of CA1 (arrow) and CA3 (arrow head) areas. Some dead cells are observed also in *hilus* (*). Data are presented as percentage in **A** and as mean \pm SEM in **B**. Abbreviations: so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*; slm, *stratum lacunosum-moleculare*; h, *hilus*; DG, dentate gyrus. Scale bar represents 500 μ m. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney non-parametric test).

FIGURE 6

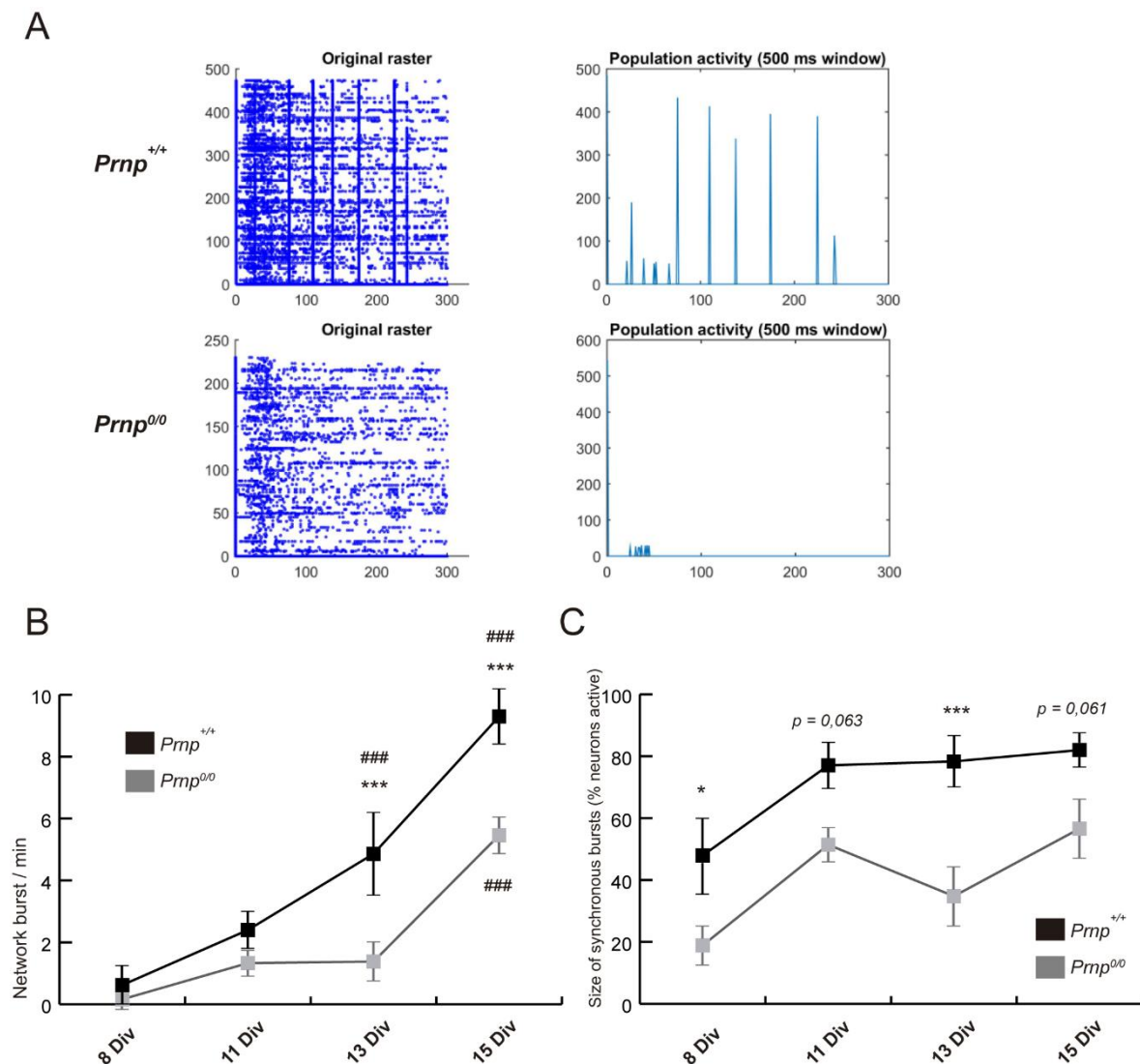


Figure 6. Reduced bursting and network formation in neuronal *Prnp*^{0/0}-derived cultures. **A**, Representative example of the raster plot obtained with the neuronal activity at 13 Div. The size of each burst is also plotted. **B**, Evolution of network bursting in *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} neuronal cultures from 8 to 15 days *in vitro* (Div). Data are presented as the mean of bursts/minute \pm SEM. **C**, Evolution of size of synchronous bursts from 8 to 15 Div. Data are presented as the mean percentage of active neurons \pm SEM. Asterisks indicate differences between *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} bursting and number signs (#) with the baseline bursting at 8 Div. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ and ### $p < 0.001$ (Anova 2-factors with sessions as repeated measures, Bonferroni's multiple comparisons test).

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

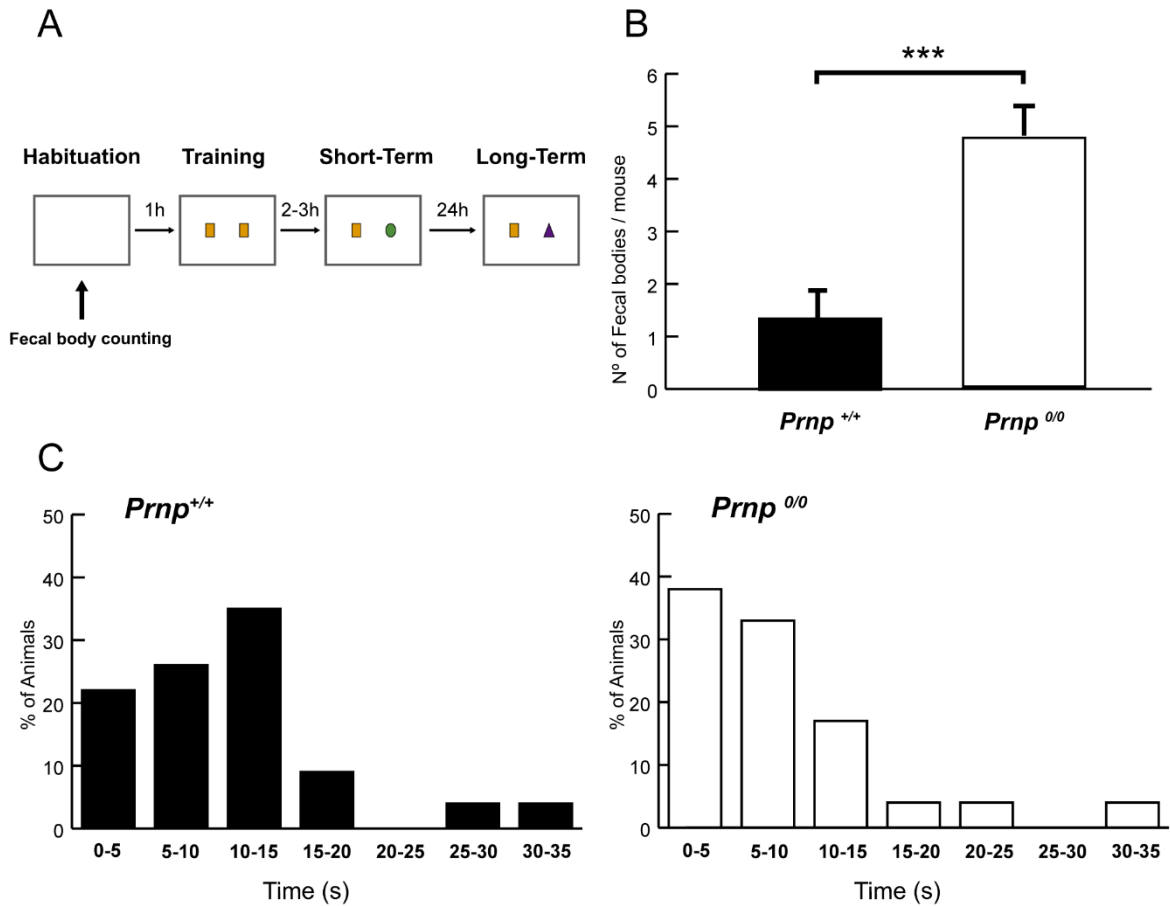


Figure S1. Stressed-like behavior in *Prnp*^{0/0} mice impairing object recognition test performance. **A**, Scheme of object recognition protocol. This consisted of 4 sessions (10 minutes). First, the animals were habituated in the empty arena. One hour later, they were placed again with two identical objects for the training session. Two to three hours later, they were placed again in the arena, changing one object to a novel one for the short-term memory test. Finally, 24 hours later, the new object was changed again to another unknown object for the long-term memory test. Fecal bodies were counted in habituation session as an indication of stress. **B**, Number of fecal bodies generated per animal during the 10-minute habituation session. Data are presented as mean \pm SEM. **C**, Time that *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} mice interacted with the objects in the short-term test. Data are presented as percentage of mice interacting with the object in each time interval during (0 to 35 s). *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney non-parametric test).

REFERENCES

- Aguzzi A, Polymenidou M (2004) Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* 116:313-327.
- Anacker C, Hen R (2017) Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility — linking memory and mood. *Nature Reviews Neuroscience* 18:335.
- Bribián A, Fontana X, Llorens F, Gavín R, Reina M, García-Verdugo JM, Torres JM, de Castro F, del Río JA (2012) Role of the cellular prion protein in oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation in the developing and adult mouse CNS. *PLoS One* 7:e33872.
- Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356:577-582.
- Carulla P, Bribián A, Rangel A, Gavín R, Ferrer I, Caelles C, Del Río JA, Llorens F (2011) Neuroprotective role of PrPC against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7-PSD-95 binding. *Mol Biol Cell* 22:3041-3054.
- Carulla P, Llorens F, Matamoros-Angles A, Aguilar-Calvo P, Espinosa JC, Gavín R, Ferrer I, Legname G, Torres JM, del Río JA (2015) Involvement of PrP(C) in kainate-induced excitotoxicity in several mouse strains. *Sci Rep* 5:11971.
- Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499:295-300.
- Clarke JR, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I, Delgado-García JM (2010) Plastic modifications induced by object recognition memory processing. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp 2652-2657.
- Coitinho AS, Roesler R, Martins VR, Brentani RR, Izquierdo I (2003) Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. *Neuroreport* 14:1375-1379.
- Colling SB, Khana M, Collinge J, Jefferys JG (1997) Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res* 755:28-35.
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370:295-297.
- Criado JR, Sanchez-Alavez M, Conti B, Giacchino JL, Wills DN, Henriksen SJ, Race R, Manson JC, Chesebro B, Oldstone MB (2005) Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis* 19:255-265.
- de Almeida CJ, Chiarini LB, da Silva JP, PM ES, Martins MA, Linden R (2005) The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J Leukoc Biol* 77:238-246.
- De Mario A, Peggion C, Massimino ML, Viviani F, Castellani A, Giacomello M, Lim D, Bertoli A, Sorgato MC (2017) The prion protein regulates glutamate-mediated Ca(2+) entry and mitochondrial Ca(2+) accumulation in neurons. *J Cell Sci* 130:2736-2746.
- Ferreira DG, Temido-Ferreira M, Vicente Miranda H, Batalha VL, Coelho JE, Szego EM, Marques-Morgado I, Vaz SH, Rhee JS, Schmitz M, Zerr I, Lopes LV, Outeiro TF (2017) alpha-synuclein interacts with PrP(C) to induce cognitive impairment through mGluR5 and NMDAR2B. *Nat Neurosci* 20:1569-1579.
- Gadotti VM, Bonfield SP, Zamponi GW (2012) Depressive-like behaviour of mice lacking cellular prion protein. *Behav Brain Res* 227:319-323.
- Jackman SL, Regehr WG (2017) The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation. *Neuron* 94:447-464.
- Kanner AM (2011) Anxiety disorders in epilepsy: the forgotten psychiatric comorbidity. *Epilepsy Curr* 11:90-91.
- Khosravani H, Zhang Y, Tsutsui S, Hameed S, Altier C, Hamid J, Chen L, Villemagne M, Ali Z, Jirik FR, Zamponi GW (2008) Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Cell Biol* 181:551-565.
- Kuffer A, Lakkaraju AK, Mogha A, Petersen SC, Airich K, Doucerain C, Marpakwar R, Bakirci P, Senatore A, Monnard A, Schiavi C, Nuvolone M, Grosshans B, Hornemann S, Bassilana F, Monk KR, Aguzzi A (2016) The prion protein is an agonistic ligand of the G protein-coupled receptor Adgrg6. *Nature* 536:464-468.

- Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457:1128-1132.
- Leighton PL, Allison WT (2016) Protein Misfolding in Prion and Prion-Like Diseases: Reconsidering a Required Role for Protein Loss-of-Function. *J Alzheimers Dis* 54:3-29.
- Lledo PM, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Nicoll RA (1996) Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2403-2407.
- Llorens F, Ansoleaga B, Garcia-Esparcia P, Zafar S, Grau-Rivera O, Lopez-Gonzalez I, Blanco R, Carmona M, Yague J, Nos C, Del Rio JA, Gelpi E, Zerr I, Ferrer I (2013) PrP mRNA and protein expression in brain and PrP(c) in CSF in Creutzfeldt-Jakob disease MM1 and VV2. *Prion* 7:383-393.
- Madronal N, Lopez-Aracil C, Rangel A, del Rio JA, Delgado-Garcia JM, Gruart A (2010) Effects of enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice. *PLoS One* 5:e11130.
- Madroñal N, Gruart A, Delgado-García JM (2009) Differing presynaptic contributions to LTP and associative learning in behaving mice. *Front Behav Neurosci* 3:7.
- Maglio LE, Perez MF, Martins VR, Brentani RR, Ramirez OA (2004) Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. *Brain Res Mol Brain Res* 131:58-64.
- Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JG, Collinge J (2002) Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *Embo j* 21:202-210.
- Manson JC, Hope J, Clarke AR, Johnston A, Black C, MacLeod N (1995) PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration* 4:113-114.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23:649-711.
- Matamoros-Angles A, Gayosso LM, Richaud-Patin Y, di Domenico A, Vergara C, Hervera A, Sousa A, Fernandez-Borges N, Consiglio A, Gavin R, Lopez de Maturana R, Ferrer I, Lopez de Munain A, Raya A, Castilla J, Sanchez-Pernate R, Del Rio JA (2018) iPS Cell Cultures from a Gerstmann-Straussler-Scheinker Patient with the Y218N PRNP Mutation Recapitulate tau Pathology. *Mol Neurobiol* 55:3033-3048.
- McKhann GM, 2nd, Wenzel HJ, Robbins CA, Sosunov AA, Schwartzkroin PA (2003) Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality, and hippocampal pathology. *Neuroscience* 122:551-561.
- Meador KJ (2007) The basic science of memory as it applies to epilepsy. *Epilepsia* 48 Suppl 9:23-25.
- Medel-Matus JS, Shin D, Sankar R, Mazarati A (2017) Kindling epileptogenesis and panic-like behavior: Their bidirectional connection and contribution to epilepsy-associated depression. *Epilepsy Behav* 77:33-38.
- Medrano-Fernandez A, Delgado-Garcia JM, Del Blanco B, Llinares M, Sanchez-Campusano R, Olivares R, Gruart A, Barco A (2018) The Epigenetic Factor CBP Is Required for the Differentiation and Function of Medial Ganglionic Eminence-Derived Interneurons. *Mol Neurobiol*.
- Nuvolone M, Kana V, Hutter G, Sakata D, Mortin-Toth SM, Russo G, Danska JS, Aguzzi A (2013) SIRPalpha polymorphisms, but not the prion protein, control phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med* 210:2539-2552.
- Nuvolone M, Hermann M, Sorce S, Russo G, Tiberi C, Schwarz P, Minikel E, Sanoudou D, Pelczar P, Aguzzi A (2016) Strictly co-isogenic C57BL/6J-Prnp^{-/-} mice: A rigorous resource for prion science. *J Exp Med* 213:313-327.
- Parrie LE, Crowell JAE, Telling GC, Bessen RA (2018) The cellular prion protein promotes olfactory sensory neuron survival and axon targeting during adult neurogenesis. *Dev Biol* 438:23-32.
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.
- Rangel A, Burgaya F, Gavin R, Soriano E, Aguzzi A, Del Rio JA (2007) Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. *J Neurosci Res* 85:2741-2755.
- Rangel A, Madronal N, Gruart A, Gavin R, Llorens F, Sumoy L, Torres JM, Delgado-Garcia JM, Del Rio JA (2009) Regulation of GABA(A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. *PLoS One* 4:e7592.
- Ratte S, Vreugdenhil M, Boulton JK, Patel A, Asante EA, Collinge J, Jefferys JG (2011) Threshold for epileptiform activity is elevated in prion knockout mice. *Neuroscience* 179:56-61.
- Reid IC, Stewart CA (1997) Seizures, memory and synaptic plasticity. *Seizure* 6:351-359.

- Rial D, Duarte FS, Xikota JC, Schmitz AE, Dafre AL, Figueiredo CP, Walz R, Prediger RD (2009) Cellular prion protein modulates age-related behavioral and neurochemical alterations in mice. *Neuroscience* 164:896-907.
- Royle SJ, Collins FC, Rupniak HT, Barnes JC, Anderson R (1999) Behavioural analysis and susceptibility to CNS injury of four inbred strains of mice. *Brain Res* 816:337-349.
- Russo SJ, Nestler EJ (2013) The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 14:609.
- Salazar SV, Gallardo C, Kaufman AC, Herber CS, Haas LT, Robinson S, Manson JC, Lee MK, Strittmatter SM (2017) Conditional Deletion of Prnp Rescues Behavioral and Synaptic Deficits after Disease Onset in Transgenic Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 37:9207-9221.
- Schmitz M, Zafar S, Silva CJ, Zerr I (2014a) Behavioral abnormalities in prion protein knockout mice and the potential relevance of PrP(C) for the cytoskeleton. *Prion* 8:381-386.
- Schmitz M, Greis C, Ottis P, Silva CJ, Schulz-Schaeffer WJ, Wrede A, Koppe K, Onisko B, Requena JR, Govindarajan N, Korth C, Fischer A, Zerr I (2014b) Loss of Prion Protein Leads to Age-Dependent Behavioral Abnormalities and Changes in Cytoskeletal Protein Expression. *Mol Neurobiol*.
- Stafstrom CE, Carmant L (2015) Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. In: *Cold Spring Harb Perspect Med*.
- Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, Macklis JD (2006) Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3416-3421.
- Striebel JF, Race B, Pathmajeyan M, Rangel A, Chesebro B (2013) Lack of influence of prion protein gene expression on kainate-induced seizures in mice: studies using congenic, coisogenic and transgenic strains. *Neuroscience* 238:11-18.
- Takada LT, Kim MO, Metcalf S, Gala, II, Geschwind MD (2018) Prion disease. *Handb Clin Neurol* 148:441-464.
- Urrea L, Segura-Feliu M, Masuda-Suzukake M, Hervera A, Pedraz L, Garcia Aznar JM, Vila M, Samitier J, Torrents E, Ferrer I, Gavin R, Hagesawa M, Del Rio JA (2018) Involvement of Cellular Prion Protein in alpha-Synuclein Transport in Neurons. *Mol Neurobiol* 55:1847-1860.
- Vassallo N, Herms J (2003) Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J Neurochem* 86:538-544.
- Vincent P, Mulle C (2009) Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* 158:309-323.
- Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, Roesler R, Izquierdo I, Cavalheiro EA, Martins VR, Brentani RR (1999) Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40:1679-1682.
- Watt NT, Taylor DR, Kerrigan TL, Griffiths HH, Rushworth JV, Whitehouse IJ, Hooper NM (2012) Prion protein facilitates uptake of zinc into neuronal cells. *Nat Commun* 3:1134.
- Watts JC, Bourkas MEC, Arshad H (2018) The function of the cellular prion protein in health and disease. *Acta Neuropathol* 135:159-178.
- Wulf MA, Senatore A, Aguzzi A (2017) The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biol* 15:34.
- You H, Tsutsui S, Hameed S, Kannanayakal TJ, Chen L, Xia P, Engbers JD, Lipton SA, Stys PK, Zamponi GW (2012) Abeta neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein, and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:1737-1742.

RESUM DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

La proteïna priònica va ser descoberta com la causant de les Encefalopaties espongiformes transmissibles, també anomenades Prionopaties (Prusiner, 1982). L'epidèmia d'encefalopatia espongiforme bovina (Wells *et al.*, 1987) i la conseqüent infecció a humans uns anys més tard (Will *et al.*, 1996) va implicar un increment en la recerca centrada en l'estudi d'aquesta proteïna. La generació dels primers models animals deficientes per la PrP^C, inesperadament, no va mostrar deficiències ni disfuncions aparents (Büeler *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1994). Tot i això, van permetre un avenç important per entendre les Prionopaties: la PrP^C no només és l'agent causant de la malaltia degut al seu plegament anòmal (PrP^{Sc}), sinó que a més, és indispensable per la infecció. Aquests models genoanul·lats no s'infectaven quan eren inoculats amb mostres de prió (Bueler *et al.*, 1993).

Es sabia que la PrP^C era indispensable pel progrés de la malaltia, però quines funcions exerceix al SNC? Els primers estudis d'expressió de la PrP^C van observar que s'expressava ja des dels primers dies de gestació embrionària per tot el SNC i el SNP (Manson *et al.*, 1992), concretament a la membrana plasmàtica neuronal on es creia que podia ser una molècula d'adhesió i participar en la citoarquitectura neural. Més endavant, es va relacionar la PrP^C amb altres funcions fisiològiques com, per exemple, la senyalització neuroprotectora contra agents proapoptòtics (Walz *et al.*, 1999; Zanata *et al.*, 2002). La PrP^C endògena es converteix en la PrP^{Sc} en la patologia i la seva expressió baixa (Llorens *et al.*, 2013a). Aquesta reducció de la PrP^C en els pacients de Prionopatia i la descripció de la seva participació en la funcions neuroprotectores van fer postular que la pèrdua de la seva funció podria ser desencadenant de la malaltia (Hetz *et al.*, 2003; Westergard *et al.*, 2007). La recerca en els darrers anys ha relacionat la PrP^C amb altres funcions rellevants pel manteniment del SNC (la neurotransmissió, la diferenciació neuronal i l'homeòstasi de cations) que han donat més pes a aquesta teoria (Nicolas *et al.*, 2009; Leighton and Allison, 2016).

Per tant, descobrir les funcions fisiològiques de la PrP^C es postula indispensable per entendre la patologia de les Prionopaties. La concreció de la seva expressió en els terminals pre- i postsinàptic (Herms *et al.*, 1999; Um *et al.*, 2012) va focalitzar l'estudi del seu paper en la sinapsi, tant en el seu establiment i maduració, com en la neurotransmissió. A nivell de la formació de la sinapsi, s'ha descrit el paper de la PrP^C en la diferenciació neuronal (Steele *et al.*, 2006), la neuritogènesi (Loubet *et al.*, 2011), i en la guia axonal mitjançant la seva interacció homofílica (Amin *et al.*, 2016). Pel que fa a la

neurotransmissió, s'ha relacionat PrP^C amb diferents elements del terminal sinàptic com el canal de K⁺ Kv 4.2 via DPP6 (Mercer *et al.*, 2013), els canals de Ca²⁺ VGCCs (Senatore *et al.*, 2012), la subunitat GluN2D dels receptors d'NMDA (Khosravani *et al.*, 2008) i el receptor metabotrópic mGluR5 (Lauren *et al.*, 2009). Aquestes interaccions s'han correlacionat a nivell funcional amb la regulació de l'AHP a l'hipocamp (Mallucci *et al.*, 2002) i l'LTP (Collinge *et al.*, 1994; Criado *et al.*, 2005). S'ha observat que la sinapsi dels animals *Prnp*^{0/0} és més excitable i susceptible a la inducció epilèptica amb PTZ i KA (Walz *et al.*, 1999).

Aquests resultats es complementen amb tres treballs del nostre grup que són el preludi d'aquesta tesi doctoral. En primer lloc, vàrem publicar que els ratolins *Prnp*^{0/0} eren més susceptibles a la inducció epilèptica per KA també en models organotípics d'hipocamp i que tenien sobreexpressades les subunitats GluK2/3 del receptor d'àcid kaïníc (Rangel *et al.*, 2007). Després observàrem que l'absència de PrP^C provocava un augment en la facilitació sinàptica i la inducció d'LTP a la via col·lateral de Schaffer de l'hipocamp, que la seva sobreexpressió també conferia una major susceptibilitat al KA i que la PrP^C regulava de forma dosi-dependent l'expressió de receptors de GABA (Rangel *et al.*, 2009). Finalment, vam demostrar que la mort neuronal provocada pel tractament amb KA depenia de la via de JNK3 i que PrP^C interactuava directament amb la subunitat GluK2/3 i la PSD-95 (Carulla *et al.*, 2011). Tot i que els resultats del grup i part de la literatura apunten al paper de PrP^C a la sinapsi i la neurotransmissió, s'han descrit resultats que apunten al contrari fent que el rol real d'aquesta proteïna no estigui definit. S'ha descrit que els animals *Prnp*^{0/0} tenen un llindar epileptogènic més elevat que els controls (Ratte *et al.*, 2011); presenten una excitabilitat normal en cultius organotípics d'hipocamp (Lledo *et al.*, 1996), i no són més susceptibles a la inducció epilèptica per KA (Striebel *et al.*, 2013b). Pel que fa a la inducció d'LTP, s'ha publicat tant que l'absència de PrP^C l'augmenta (Rangel *et al.*, 2009), la redueix (Manson *et al.*, 1995; Criado *et al.*, 2005) o no hi afecta (Lledo *et al.*, 1996).

Fa pocs anys, es va donar una possible explicació aquests controvertits resultats. Es va demostrar que durant la generació del model murí deficient per la PrP^C més utilitzat, el ZHI (Büeler *et al.*, 1992), es van barrejar fons genètics 129Sv i C57BL6 fent que l'animal *Prnp*^{0/0} presentés uns *Flanking genes* 129Sv absents en l'animal *Prnp*^{+/+} fent-ne imperfecta la comparació. En el mateix article, es demostra que la regulació de l'autofàgia atribuïda a PrP^C (de Almeida *et al.*, 2005), és realment desenvolupada per un d'aquests gens, el *Sirpa* (Nuvolone *et al.*, 2013). Aquest fenomen ha fet replantejar els resultats descrits fins al moment.

Una de les darreres funcions descrites, i que ha fet encara més interessant l'estudi de PrP^C, és la seva participació en la malaltia d'Alzheimer i la regulació de la proteïna Tau (Lauren *et al.*, 2009). En aquest sentit, s'han descrit molts de casos de Prionopatia que presenten comorbiditat amb Taupatia apuntant a la relació entre les dues patologies (Kovacs *et al.*, 2017). Tot i que el paper específic de PrP^C en les Taupaties no està del tot definit, sembla que participaria en la patologia i en la regulació de la fosforilació i l'expressió de la proteïna Tau.

En aquest present projecte de tesi abordem l'estudi de les funcions fisiològiques de PrP^C per intentar entendre millor les Prionopaties. Els resultats que hem obtingut es presenten en tres capítols. En el primer, ens hem centrat en la relació de PrP^C amb la regulació de la Tau en un model de Prionopatia amb comorbiditat amb Taupatia. En el segon, hem continuat la línia experimental del grup (Rangel *et al.*, 2009; Carulla *et al.*, 2011) per elucidar el paper real de PrP^C en la modulació epilèptica per KA. I finalment, a partir del nou model de ratolí *Prnp*^{0/0} amb un fons genètic pur (Nuvolone *et al.*, 2016), hem estudiat les conseqüències de l'absència de PrP^C en l'excitabilitat sinàptica, la conducta i l'aprenentatge.

1. Les iPSC derivades d'una pacient de GSS amb la mutació Y218N reproduïxen el fenotip neurodegeneratiu de la Taupatia

Fa ja vuit dècades, es va descriure la presència de cabdells neurofibril·lars en cervells de pacients amb una simptomatologia i histopatologia atípiques d'herència familiar que els autors no van saber diagnosticar (Worster-Drought C *et al.*, 1940). Més endavant, es va descriure que podria haver sigut la primera cita d'un cas de Prionopatia familiar (GSS) amb comorbiditat amb Taupatia (Azzarelli *et al.*, 1985). Des de llavors s'han descrit múltiples casos on les dues patologies es presenten juntes i s'ha postulat una relació directa entre les mutacions de la PrP^C, que causen aquestes Prionopaties familiars, i els NFTs típics de les Taupaties (Hsiao *et al.*, 1992; Simpson *et al.*, 2013; Ishizawa *et al.*, 2018). Seguint aquesta línia, s'ha descrit la relació directa entre la PrP^C i la proteïna Tau, component principal dels NFTs (Wang *et al.*, 2008; Vergara *et al.*, 2015), però encara no s'ha definit clarament quin paper té a la patologia.

En el primer capítol d'aquesta tesi estudiem la implicació de la PrP^C amb la regulació de la Tau en un d'aquests casos de comorbiditat entre Prionopatia i Taupatia per entendre el paper de la PrP^C en la relació de les dues patologies. Aquest pacient presentava demència, dèficits en la parla i mioclònies i va ser diagnosticat amb FTD. La histopatologia *post-mortem* va descobrir cúmuls de PrP^{Sc} i NFTs, i l'estudi genètic una mutació a *Prnp* mai descrita, la Y218N. Finalment, fou diagnosticat amb GSS amb neurodegeneració fibril·lar (Alzualde *et al.*, 2010).

Generació pionera d'un model d'iPSC procedent de pacients amb Prionopatia

En aquest estudi hem desenvolupat el primer model d'iPSC procedent d'un pacient amb Prionopatia. Es van extreure fibroblasts d'un familiar del pacient descrit per Alzualde i

col·laboradors que presentava també la mutació Y218N, així com d'un control emparellat de sexe i edat. Es van infectar amb retrovirus amb els gens *Sox2*, *Klf4*, *Oct4* i *c-Myc* per generar les iPSC. La seva caracterització va demostrar una plena reprogramació: 1) desmetilació dels promotors de *Oct4* i *Nanog*; 2) silenciament dels transgens de reprogramació infectats; 3) activació transcripcional dels factors de pluripotència endògens; 4) expressió proteica dels factors de transcripció associats a pluripotència i marcadors de membrana (SSEA3, SSEA4, TRA-1-81, SOX2, Nanog i OCT4); 5) cap alteració en el cariotip; i 6) capacitat de diferenciació als tres llinatges germinals.

Fins al moment, s'havien generat iPSC d'altres malalties neurodegeneratives com la malaltia de Parkinson (Soldner *et al.*, 2009), la demència frontotemporal (Iovino *et al.*, 2015; Wren *et al.*, 2015), la malaltia d'Alzheimer (Israel *et al.*, 2012), la corea de Huntington (Jeon *et al.*, 2012) i l'esclerosi lateral amiotròfica (Zhang *et al.*, 2015). No obstant, en les Prionopaties, el cas que aquí descrivim és el primer i l'únic. Hem generat el primer model *in vitro* provinent de cèl·lules humanes per estudiar aquesta malaltia.

La mutació Y218N-*Prnp* altera la diferenciació neuronal i l'*splicing* alternatiu de Tau

Hem diferenciat amb dos protocols les iPSC a neurones. Per una banda, s'ha utilitzat un protocol de diferenciació a neurones cortical directe (Espuny-Camacho *et al.*, 2013) que ens ha permès mantenir les neurones en cultiu més de 200 dies *in vitro*. Per l'altra, el segon protocol genera precursors neurals intermedis que es poden mantenir en cultiu durant setmanes permetent una diferenciació seqüencial i controlada (Cho *et al.*, 2008). En els dos casos hem aconseguit l'establiment d'un cultiu neural madur i els mateixos resultats.

L'anàlisi transcriptòmica per Rt-qPCR mostra que les cèl·lules derivades del pacient presenten un endarreriment en la diferenciació neuronal. Els marcadors de precursors neurals *Nestina* i *Sox2* no es veuen alterats, en canvi, els que denoten maduració neuronal, *Mapt*, *Map2* i *Vglut* s'expressen significativament menys en el cultiu Y218N en l'últim estadi de la diferenciació (>120 Div). També s'observen diferències en el marcador d'interneurones *Calb1*, és significativament major en el control a l'estadi inicial i mitjà de la diferenciació. A més, l'expressió del marcador astrocític *GFAP* també està augmentada en el darrer estadi. En aquest cas hem comprovat que no suposa un augment d'astròcits ja que el comptatge del nombre de cèl·lules GFAP positives no denota cap diferència entre els dos cultius. S'observa clarament un gran contingut de fascicles gruijuts immunoreactius GFAP positius denotant astrogliosi en el cultiu Y218N. Finalment, resultats preliminars d'imatge de Ca²⁺ amb Fluo-4M denoten una menor activació en les neurones Y218N.

La PrP^C s'ha relacionat prèviament amb la regulació de la proliferació i la diferenciació neural. S'ha descrit que l'absència de PrP^C provoca una reducció de la proliferació *in vitro* en neuroesferes (Santos *et al.*, 2011), *in vivo* al DG i la SVZ dels animals genoanul·lats i que la PrP^C regula positivament la diferenciació neuronal (Steele *et al.*, 2006). A més, s'ha observat el seu paper en la formació de les neurites en línies cel·lulars (Loubet *et al.*, 2011) i cultius primaris d'hipocamp (Santucci *et al.*, 2005). Seguint aquesta línia, el nostre grup va descriure en la línia cel·lular de neuroblastoma Neuro2a, que la sobreexpressió de PrP^C incrementa la formació de fil·lopodis regulant el citoesquelet d'actina via Akt (Llorens *et al.*, 2013b). Per tant, aquests resultats ens permeten postular que la PrP^C participaria en la regulació del cicle cel·lular dels progenitors neurals modulant la diferenciació neuronal a través, potser, de la regulació del citoesquelet. Tot i que les conseqüències de la mutació Y218N a la PrP^C no es coneixen, un estudi *in silico* apunta a que aquesta mutació provocaria un plegament anòmal a la proteïna que podria afectar a la seva funció fisiològica i també fer-la més propensa a generar propagons *scrapie* (Cheng and Daggett, 2014). Per tant, igual com s'ha demostrat que fa la seva absència, el seu plegament anòmal podria afectar la seva regulació de la diferenciació neuronal.

Les neurones derivades de les iPSC Y218N-Prnp reproduïen la Taupatia però no la generació de PrP^{Sc}

Un cop diferenciades les iPSC a neurones madures, hem comprovat si recapitulen el fenotip original del pacient. Tot i no reproduir la generació espontània de PrP^{Sc}, les neurones Y218N presenten nivells significativament més elevats de p-Tau i una redistribució d'aquesta proteïna a l'espai somatodendrític. El comptatge de nuclis picnòtics al darrer estadi de diferenciació mostren significativament una major mort neuronal apoptòtica. També s'observa una clara astrogliosi en el cultiu Y218N. Per tant, hem reproduït gran part de la patologia de la GSS, sobretot lligada a la neurodegeneració fibril·lar.

Els depòsits de Tau hiperfosforilada han estat àmpliament descrits en diferents tipus de Prionopaties. Trobem cites en pacients de sCJD (Kovacs *et al.*, 2017), de vCJD (Giaccone *et al.*, 2008), de fCJD (Kovacs *et al.*, 2011) i de FFI (Jansen *et al.*, 2011). Són notoris sobretot els casos descrits a la GSS, com el que en aquesta tesi reportem (Alzualde *et al.*, 2010), lligats a diferents mutacions a *Prnp* (Ghetti *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 2013; Ishizawa *et al.*, 2018). La descripció histopatològica detallada d'alguns cassos de GSS ha descrit NFTs adjacents als agregats amiloides de PrP^{Sc} apostant per una relació directa (Ishizawa *et al.*, 2002). Fins i tot, alguns autors consideren la GSS com una Taupatia

secundària per la freqüent aparició d'aquests NFTs (Fuster-Matanzo *et al.*, 2018). A més, nivells elevats de p-tau es detecten al CSF de pacients de CJD, esdevenint inclús biomarcadors per la diagnosi (Goodall *et al.*, 2006; Zerr *et al.*, 2017). *In vivo* s'ha observat un augment de p-Tau en ratolins inoculats amb prions RML (Race *et al.*, 2016), derivats de la BSE (Bautista *et al.*, 2006) i de la GSS (Lawson *et al.*, 2011). Aquests resultats apunten a que l'agregació de la PrP^{Sc} en la patologia altera la dinàmica de fosforilació de Tau i en propicien el seu cúmul.

Tot i que el guany de funció patològica de la PrP^C en agregar-se sembla clar, no podem obviar l'alteració de la funció fisiològica de la PrP^C en la regulació de Tau. En aquest treball, observem disfuncions derivades de la Taupatia a les cèl·lules Y218N sense presentar PrP^{Sc}. En aquest sentit, la relació entre PrP^C i Tau s'ha descrit en el context de la malaltia d'Alzheimer on no es troba tampoc aquesta agregació priònica i, per tant, és la conformació nativa qui participa en la modulació. S'ha descrit que la PrP^C seria un receptor dels oligòmers d'A β i que induiria la seva toxicitat via mGluR5/Fyn (Brody and Strittmatter, 2018). La interacció directa entre PrP^C i Tau ha estat publicada (Han *et al.*, 2006) i, recentment, s'ha descrit que la inhibició de la LTP induïda per la inoculació d'agregats de Tau *in vivo* és conduïda per la PrP^C (Ondrejcek *et al.*, 2018). A més, és important remarcar la possible modulació directa de la fosforilació de Tau per part de la PrP^C ja que la seva expressió s'ha relacionat amb l'expressió i modulació de cinases implicades en la fosforilació de Tau com la GSK3, la Cdk5 (Benvegnu *et al.*, 2011) i la Fyn (Larson *et al.*, 2012; De Mario *et al.*, 2015).

Els nostres resultats no ens permeten afirmar que la mutació Y218N a la PrP^C alteri directament la regulació de la fosforilació de Tau, però n'observem una relació causa-efecte. Les cèl·lules Y218N infectades amb inòculs de GSS i de sCJD presenten una redistribució somatodendrítica de p-Tau, típica dels cassos de Prionopatia amb comorbiditat amb Taupatia i de les Taupaties en general (Lee *et al.*, 2001). La nostra hipòtesi és que la mutació Y218N modificaria la conformació de la PrP^C alterant la seva modulació de les vies de senyalització que fosforilen Tau i la pròpia interacció amb la proteïna Tau, tal com ja s'ha descrit en les mutacions P102L, 2-OPRI i 7-OPRI (Wang *et al.*, 2008). Recentment, s'ha descrit el paper de la cinasa Fyn, en la redistribució somatodendrítica de Tau en models d'inoculació d'A β *in vivo* (Li and Gotz, 2017). Com ja hem comentat, s'ha observat també que la PrP^C interactua amb l'A β regulant la seva toxicitat via Fyn (Um *et al.*, 2012), per tant, la mutació Y218N a PrP^C podria alterar la via de senyalització de Fyn propiciant la redistribució de Tau.

Desafortunadament, les cèl·lules Y218N no generen PrP^{Sc} de forma espontània amb cap dels dos protocols de diferenciació. A més, els assajos d'infectivitat amb mostres de

pacients de GSS i sCJD fallen en la replicació del prió *in vitro*, tot i que s'observa un increment de la redistribució de p-Tau indicant que sí que han afectat al cultiu. Aquest resultat, tot i ser una mica decebedor, era més o menys esperable ja que fins avui no s'ha aconseguit la generació de prions humans *in vitro* amb cultius neuronals, ni amb models murins de GSS (P102L i A117V) (Asante *et al.*, 2009). *In vivo*, només s'ha aconseguit després de la inoculació amb mostres de pacients de GSS (Asante *et al.*, 2013; Asante *et al.*, 2015). Fins avui, no hi ha cap publicació en aquest sentit amb la mutació Y218N, denotant potser, la seva baixa capacitat infectiva. Deixant de banda que un cultiu *in vitro* i el que ocorre en un cervell difereixen notablement afectant segur a la dinàmica de la patologia, pensem que l'absència de generació espontània de PrP^{Sc} en el nostre cultiu Y218N podria ser deguda al període d'incubació i al model de cultiu utilitzat. Hem de pensar que la GSS, com les altres Prionopaties familiars, apareixen de mitjana als 50-60 anys, mostrant períodes d'incubació molt llargs. A més, concretament la GSS, presenta una progressió lenta comparada amb els altres subtipus de Prionopatia. La mitjana de supervivència després dels primers símptomes és d'uns 4 anys i, en canvi, en el sCJD i el fCJD és de 6-12 mesos (Ladogana and Kovacs, 2018; Takada *et al.*, 2018). Per tant, és esperable que 200 dies no siguin suficients per la generació espontània d'agregats PrP^{Sc}, tenint en compte a més, que fins a l'últim estadi (~120 Div) no tenim un cultiu neuronal madur on es pugui generar. Pensem també que l'aproximació de cultiu 2D que hem seguit no és l'òptima per propiciar l'agregació. En models d'IPSC procedents de pacients d'Alzheimer, s'ha aconseguit la generació espontània d'A β amb cultius 3D denotant la importància de la matriu extracel·lular en l'agregació (Raja *et al.*, 2016). Per tant, entenem que un cultiu incloent les cèl·lules en una matriu de Matrigel o amb models d'organoïdes hagués, potser, aconseguit l'agregació i generació de la PrP^{Sc}.

La propagació de prions *in vitro* s'ha demostrat en múltiples models: línies cel·lulars (Klohn *et al.*, 2003) cultius organotípics (Falsig and Aguzzi, 2008) i cultius primaris (Cronier *et al.*, 2004), però sempre amb mostres de BSE, *scrapie* o humanes adaptades a ratolí. En canvi, només s'han publicat dos treballs utilitzant mostres humanes, i cap d'ells utilitza mostres de Prionopaties familiars. El primer treball aconsegueix la infecció amb una línia cel·lular de neuroblastoma humana amb mostres de sCJD (Ladogana *et al.*, 1995) i l'altre ho fa amb astròcits derivats d'IPSC humanes amb inòculs de vCJD i de sCJD (Krejciova *et al.*, 2017). Aquests resultats apunten de nou a la baixa infectivitat que tindria la PrP^C amb mutacions puntuals com el nostre cas. Pensem que és important apuntar també, que en el nostre cultiu principalment neuronal no estan presents tots els tipus cel·lulars que trobem en el SNC, com la micròglia, relacionada amb la inflamació i la infectivitat prionica (Aguzzi and Zhu, 2017).

Alteració de l'*splicing* alternatiu de Tau i afectació en el trànsit mitocondrial en les neurones Y218N-*Prnp*

Hem descrit en les neurones Y218N un augment significatiu del ràtio Tau 3R/Tau 4R. Aquest increment prové de la disminució de l'expressió de la isoforma Tau 4R. Les isoformes 3R s'expressen més durant el desenvolupament del SNC sent les úniques en el SNC fetal. En el SNC adult, l'expressió de la Tau 4R augmenta i la ràtio Tau 3R/Tau 4R s'igualava fins a ~1:1 (Goedert and Jakes, 2005). A l'hipocamp adult murí, s'ha descrit una expressió notòria de la Tau 3R sobretot en els progenitors neurals (Bullmann *et al.*, 2007). L'expressió de la isoforma Tau 4R augmenta al llarg de la diferenciació neuronal, i per tant, els nostre resultat podria indicar que el cultiu Y218N presenta una diferenciació endarrerida ja que la ràtio s'igualava a l'últim estadi de la diferenciació. Aquest resultat encaixaria amb l'endarreriment de l'expressió de marcadors de maduració neuronal (*Map2* i *Vglut1*) que hem descrit anteriorment.

L'expressió de PrP^C regula positivament la diferenciació neuronal com hem comentat (Steele *et al.*, 2006), i aquesta diferenciació incrementa l'expressió de la Tau 4R. Per tant, és una explicació plausible que la disfunció de la PrP^C-Y218N, degut a la seva mutació, endarrerixi la diferenciació neuronal i que aquesta alteració acabi afectant a la ràtio Tau3R/Tau 4R. No obstant, no podem descartar que aquesta desregulació formi part de la etiologia de la malaltia *per se* tal com s'ha descrit en altres Taupaties com la FTD, la Degeneració corticobasal i la malaltia de Pick (Fuster-Matanzo *et al.*, 2018). S'ha descrit inclús en un model d'iPSC provinent d'un pacient amb FTD (Biswas *et al.*, 2016). El nostre seria el primer cop que es descriuria aquesta alteració en una Prionopatia.

Finalment, hem observat també una reducció significativa de la velocitat del trànsit mitocondrial en les neurones Y218N. S'ha descrit la presència de PrP^C al mitocondri (Faris *et al.*, 2017a) i que la respiració mitocondrial es veu afectada durant la infecció de prions *in vivo* (Faris *et al.*, 2017b). No hem mirat en el nostre model si hi ha cap alteració en la viabilitat mitocondrial que pugui explicar la reducció de la seva mobilitat. Sí que hem observat l'alteració en l'*splicing* alternatiu de Tau i la seva fosforilació aberrant. Es coneix que la isoforma Tau 3R només presenta 3 motius d'unió als microtúbuls fent-la menys afí. Això fa que perdin estabilitat i el trànsit vesicular per dineïnes i kinesines que transporten els mitocondris es vegi reduït (Lee *et al.*, 2001). La hiperfosforilació de Tau també s'ha descrit que redueix l'afinitat de les kinesines i dineïnes als microtúbuls (Ballatore *et al.*, 2007). Per tant, els nostres resultats ens fan pensar que és l'alteració en l'*splicing* i fosforilació de Tau els responsables de la reducció del trànsit mitocondrial que hem observat, tot i que no podem descartar una afectació directa al mitocondri.

Les iPSC com a nova estratègia per estudiar les oblidades malalties neurodegeneratives minoritàries, i en el nostre cas també, la relació de PrP^C i Tau

L'estudi de les malalties neurodegeneratives recau en les mostres de pacients *post mortem*. Això ens dóna una instantània de la patologia en un estadi normalment molt avançat. En malalties amb una elevada incidència i una esperança de vida llarga des de l'aparició dels primers símptomes, com la malaltia d'Alzheimer i la de Parkinson, amb els anys s'ha aconseguit també una bateria de mostres en estadis primerencs i intermedis de la patologia gràcies a la inclusió de mostres procedents de pacients que traspassen degut a causes alienes a la malaltia neurodegenerativa abans que aquesta hagi avançat. A la literatura, trobem incomptables treballs que analitzen mostres de pacients d'Alzheimer ordenades segons els estadis de Braak (Braak and Braak, 1991). L'obtenció d'aquestes mostres seqüencials ha permès la descripció de com avança la patologia tan a nivell histopatològic com molecular. En canvi, en altres malalties neurodegeneratives minoritàries, amb una incidència molt baixa, la disponibilitat de mostres és, per qüestions òbvies, bastant més reduïda. En el cas de les Prionopaties, a més, s'afegeix que la supervivència des de l'aparició dels primers símptomes és molt curta (1-2 anys de mitjana). A més, quan apareix la simptomatologia l'afectació al SNC és ja molt elevada. Inclús, tot i que el diagnòstic pot ser inferit en vida del pacient (CSF, EEG, MMSE), la diagnosi definitiva de les Prionopaties és *post mortem*. Per tant, és pot factible obtenir una gran quantitat de mostres en diferents estadis de la malaltia que ens permetin entendre els factors que regulen la seva progressió. En aquest sentit, projectes com el que aquí presentem d'iPSC derivades de pacients poden ser una bona alternativa per estudiar l'avenç de la patologia en aquestes malalties neurodegeneratives minoritàries i de progressió ràpida. Ens permetran estudiar a nivell cel·lular i molecular com va progressant la malaltia al llarg de la maduració del cultiu.

En conclusió d'aquest capítol de la tesi, hem descrit el primer model d'iPSC procedent d'un pacient amb Prionopatia que ens permetrà estudiar la participació de la PrP^C en la diferenciació neuronal i la fosforilació de Tau. Aquesta línia cel·lular pot esdevenir una nova plataforma per estudiar la comorbiditat Prionopatia-Taupatia en un model derivat directament de pacients.

2. La PrP^C exerceix un paper neuroprotector a l'epilèpsia induïda per l'àcid kaínic

Els primer treball que va estudiar el paper de la PrP^C en la neurotransmissió amb un model *Prnp*^{0/0} va descriure què l'absència de la PrP^C provocava una disminució de la inhibició gabaèrgica que podria repercutir en una major excitabilitat sinàptica (Collinge *et al.*, 1994). Més endavant, es va observar una reorganització de les fibres molsoses de l'hipocamp de l'animal genoanul·lat similar a les que es troben en els pacients epilèptics (Colling *et al.*, 1997). S'havia descrit també que la degeneració sinàptica era uns dels trets inicials de la patologia del CJD (Clinton J *et al.*, 1993). Aquestes observacions, sumades a què l'epilèpsia és una patologia present en els pacients de CJD (Wieser HG *et al.*, 2006), es va plantejar la possibilitat que la PrP^C tingués algun rol en la funció sinàptica i l'epilèpsia. Seguint aquesta línia, Walz i col·laboradors van ser els primers en tractar ratolins *Prnp*^{0/0} amb PTZ, KA i pilocarpina per estudiar la seva resposta epilèptica. Amb els tres models van observar que l'animal genoanul·lat presentava una gran susceptibilitat a sofrir episodis epilèptics (Walz *et al.*, 1999).

Després d'aquesta primera aproximació, altres grups, inclòs el nostre, han intentat entendre quin és el paper de la PrP^C en la neuroprotecció epilèptica. En el moment d'iniciar aquesta tesi, s'havien publicat resultats contradictoris al respecte. Hi havia treballs on s'observava una susceptibilitat epilèptica exacerbada en els animals *Prnp*^{0/0} (Rangel *et al.*, 2007; Rangel *et al.*, 2009; Carulla *et al.*, 2011; Fleisch *et al.*, 2013). Contràriament, altres grups havien descrit que no hi havia diferències amb els animals control (Striebel *et al.*, 2013b) o que l'absència de la PrP^C, inclús provocava un augment del llindar epilèptic (Ratte *et al.*, 2011). Striebel i col·laboradors van apuntar que la disparitat de resultats podia provenir de la comparació de models de ratolí amb diferents fons genètics mixtes (Striebel *et al.*, 2013a). El mateix any, es va demostrar la presència d'una part del genoma de fons genètic 129Sv en diversos models murins *Prnp*^{0/0} i no en els seus germans *Prnp*^{+/+}. Aquesta descoberta apuntava a què els controls que s'havien estat utilitzant no eren perfectes i podien emascarar les funcions de la PrP^C (Nuvolone *et al.*, 2013).

En aquest context, en el segon capítol d'aquesta tesi, hem tractat amb àcid kaínic diferents models murins genoanul·lats per desxifrar el paper real de la PrP^C en la neuroprotecció

epilèptica independentment del fons genètic dels ratolins. Hem comparat els models: B6129 o ZHI (Büeler *et al.*, 1992), el ZHI retrocreuat amb C57BL6 (B6.129), el 129/Ola (Manson *et al.*, 1994) i el FVB/N (Lledo *et al.*, 1996). També hem estudiat quins dominis de la PrP^C són els necessaris per aquesta neuroprotecció epilèptica.

Els ratolins *Prnp*^{0/0} són més susceptibles al KA

Els nostres resultats mostren que tant el FVB/N-*Prnp*^{0/0} com el FVB/N-*Prnp*^{+/+} presenten una elevada susceptibilitat a la inducció epilèptica per KA independentment de la seva expressió de PrP^C. Diversos treballs descriuen que els ratolins FVB/N són molt susceptibles a l'excitotoxicitat i l'epilèpsia. Per tant, no es considera un bon model per estudiar l'epilèpsia ja que de forma basal presenta una resposta exacerbada que pot emascarar la diferència de resposta en ratolins transgènics (Ferraro *et al.*, 2002; McKhann *et al.*, 2003). Aquests resultats ens permetrien entendre la disparitat de resultats amb el treball de Ratte i col·laboradors ja que utilitzen cultius organotípics hipocàmics del ratolí FVB/N-*Prnp*^{0/0} (Ratte *et al.*, 2011).

En canvi, els ratolins 129/Ola-*Prnp*^{0/0} i B6129-*Prnp*^{0/0} són més susceptibles al KA que els seus controls, tot i que el fenotip epilèptic que presenten és una mica diferent. El percentatge d'animals 129/Ola-*Prnp*^{0/0} que assoleixen l'estadi VI és menor i, a diferència dels B6129-*Prnp*^{0/0}, cap acaba morint. Múltiples factors desconeguts podrien provocar aquestes diferències, tot i que semblen intrínseques de la susceptibilitat dels ratolins segons el seu fon genètic. El fenotip epilèptic dels animals B6129-*Prnp*^{+/+} és també més exacerbada que el dels 129/Ola-*Prnp*^{+/+}. Seguint aquesta línia, s'ha publicat que el model 129/P, provinent de la mateixa soca que el 129/Ola, presenta una resposta epilèptica a injeccions de KA a l'amígdala molt inferior als ratolins C57BL6 (Almeida Silva *et al.*, 2016). A més, l'expressió de la PrP^C al cervell dels ratolins 129/Ola-*Prnp*^{+/+} és lleugerament major que en els B6129-*Prnp*^{+/+}, factor que podria, també, fer-los més resistent.

La tinció de Fluor Jade B ens ha permès corroborar que la mort neuronal per excitotoxicitat a l'hipocamp, típica en els models d'epilèpsia (Vincent and Mulle, 2009), depèn de l'expressió de la PrP^C. Mostrem que en l'animal 129/Ola-*Prnp*^{0/0} la mort neuronal es redueix a la capa piramidal de la regió CA3 i, en canvi, en el B6129-*Prnp*^{0/0} també l'observem a la capa piramidal de la CA1. A més, els dos models genoanul·lats presenten una notòria astrogliosi a la regió CA3 degut a la inducció epilèptica i un increment dels marcadors proinflamatoris *TNFα* i *IL1β*. L'astrogliosi s'ha descrit en pacients i models animals d'epilèpsia i es considera una conseqüència directa de l'excitotoxicitat (Foresti *et al.*, 2011; Vizuete *et al.*, 2018).

En el treball d'Striebel i col·laboradors no observen diferències entre el model 129/Ola-*Prnp*^{0/0} i el seu control en la resposta a KA. Pensem que aquesta diferència podria raure sobretot en el protocols d'administració de l'agonista i en el mètode d'anàlisi del fenotip epilèptic (Striebel *et al.*, 2013b). En aquesta tesi utilitzem tres injeccions de 10mg/Kg de KA (cada 30 minuts) i dividim la resposta epilèptica en sis estadis. En canvi, en el seu cas, administren quatre injeccions de 8mg/Kg, també cada 30 minuts, i divideixen la resposta en cinc estadis d'afectació. L'ús de diferents aproximacions dificulta molt la comparació tenint en compte la importància de la dosi en els models d'epilèpsia. No obstant, si ens fixem amb les seves dades, sí que observen un augment significatiu del temps d'afectació epilèptica dels mascles 129/Ola-*Prnp*^{0/0} respecte al 129/Ola-*Prnp*^{+/+}, però no de les femelles. Com que el percentatge d'animals que arriben a cada estadi d'afectació no és diferent i tampoc observen el mateix amb les femelles, consideren aquests resultat negligible. Per una banda, s'ha descrit que el període de l'estre de les femelles de ratolí afecta a la seva excitabilitat sinàptica (Scharfman *et al.*, 2003), variable que no tenen en compte. Tampoc concreten l'edat dels animals que utilitzen (en el nostre cas tots de 8-12 setmanes), factor relacionat amb la resposta epilèptica al KA (McCord *et al.*, 2008) i directament amb les conseqüències *in vivo* de l'absència de la PrP^C en la conducta i les funcions hipocàmiques (Rial *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2014a). En resum, pensem que els dos treballs no són contradictoris, senzillament enfoquen la qüestió amb aproximacions bastant diferents i això ens dona resultats dispars que necessàriament no han de ser oposats.

Els *Flanking genes* exacerben el fenotip epilèptic en el model ZHI

En aquest estudi comparem la resposta epilèptica del model B6129 amb el B6.129 per entendre la participació dels *Flanking genes* en la neuroprotecció epilèptica, tal com ja s'havia descrit en la regulació de la fagocitosi (Nuvolone *et al.*, 2013). El retrocreuament durant 8 generacions del ratolí B6129 amb animals purs C57BL6 (B6) ha reduït els microsatèl·lits provinents del fons 129 del ~40 % al ~7 %. Aquesta disminució ha reduït la susceptibilitat epilèptica dels ratolins B6.129-*Prnp*^{0/0}, tot i que encara és major que la dels seus controls, indicant que els *Flanking genes* podrien haver exagerat les conseqüències de l'absència de la PrP^C en la neuroprotecció epilèptica.

Nuvolone i col·laboradors, al treball on demostren l'existència d'aquests *Flanking genes*, mostren una seixantena de gens amb polimorfisme 129Sv al B6129-*Prnp*^{0/0} que en el B6129-*Prnp*^{+/+} són B6. Descriuen que un d'aquests gens, el *Sirpa*, seria realment l'encarregat de la regulació de la capacitat fagocítica dels macròfags, i no la PrP^C (de

Almeida *et al.*, 2005). Demostren que el polimorfisme *Sirpa*¹²⁹, només present als animals B6129-*Prnp*^{0/0}, incrementa la capacitat fagocítica dels macròfags respecte al polimorfisme *Sirpa*^{B6} que presenten els B6129-*Prnp*^{+/+} (Nuvolone *et al.*, 2013). Els nostres resultats no ens permeten afirmar que les diferències que observem també recaiguin en aquests gens. No obstant, la literatura publicada sobre aquests *Flanking genes* ens posa sobre la taula uns quants candidats que podrien haver-ho fet. El propi *Sirpa* s'ha relacionat amb la resposta a l'estrès oxidatiu en un model d'isquèmia (Wang *et al.*, 2012), amb la maduració neuronal depenent d'activitat (Toth *et al.*, 2013) i amb la poda sinàptica (Lehrman *et al.*, 2018). Altres vuit gens també podrien haver exacerbat la funció neuroprotectora ja que s'han relacionat amb funcions del SNC com la neurotransmissió, el glioblastoma, l'LTP i la neuroprotecció: *Prex1* (Jackson *et al.*, 2010), *Traf1* (Lu *et al.*, 2013), *Thbs1* (Okada-Tsuchioka *et al.*, 2014), *Rmdn3* (Petri *et al.*, 2011), *Tyro3* (Li *et al.*, 2013), *Slc304* (Aguilar-Alonso *et al.*, 2008), *Mertk* (Neher *et al.*, 2013) i *B2m* (Nelson *et al.*, 2013).

La neuroprotecció de PrP^C necessita el seu ancoratge a membrana pel domini GPI

L'aproximació *in vitro* amb cèl·lules Neuro2a tractades amb PLC o Gli ens indica que la funció neuroprotectora de la PrP^C depèn del seu ancoratge a membrana. Descartem així que aquesta regulació es donés a nivell citoplasmàtic. Per una banda, la seva desunió amb la membrana plasmàtica podria implicar una pèrdua de la funció neuroprotectora de la PrP^C com si d'una cèl·lula deficient per la PrP^C es tractés. Per l'altra, pensem que també podria implicar *per se* un augment de citotoxicitat i una desregulació de l'estrès oxidatiu segons resultats previs amb models animals amb la PrP^C truncada sense GPI (PrP^{ΔGPI}). Altres treballs han considerat el domini GPI necessari per la toxicitat en les Prionopaties ja que els ratolins que expressen la PrP^{ΔGPI} presenten plaques amiloides *in vivo*, però sense simptomatologia clínica de la patologia (Chesebro *et al.*, 2005). Diferents estudis han postulat que la interacció del domini N-terminal de la PrP^C amb la membrana plasmàtica degut a la unió amb anticossos o a l'expressió de formes truncades sense el domini globular indueixen efectes neurotòxics (Sonati *et al.*, 2013; Herrmann *et al.*, 2015) i comprometen la resposta a estrès oxidatiu (Zeng *et al.*, 2003). Per tant, podria ser que el tractament amb PLC i Gli generés formes truncades de la PrP^C que fossin més o menys tòxiques augmentant la seva sensibilitat al KA.

El domini dels *octarepeats* és el responsable de la neuroprotecció al KA

L'estructura terciària de la PrP^C i els seus dominis són importants per al seu plegament, funció i capacitat infectiva (Wille and Requena, 2018). La PrP^C presenta un domini globular proper a l'ancoratge a membrana i un domini N-terminal flexible sense una estructura definida. S'ha descrit que aquesta segona regió regula l'endocitosi de la proteïna (Pauly and Harris, 1998) i que s'uneix directament a cations divalents com el Zn²⁺ (Walter *et al.*, 2007) i el Cu²⁺ (Brown *et al.*, 1997). S'ha observat que la PrP^C regula l'activitat del receptor d'NMDA dependent de la seva unió al Cu²⁺ (Gasperini *et al.*, 2015). Aquests resultats ens van permetre postular que el domini N-terminal podria participar en la neuroprotecció.

Per intentar entendre el paper del domini N-terminal en la neuroprotecció, tractem amb KA ratolins que expressen les formes truncades, PrP^{ΔC4} i PrP^{ΔF35}. Ambdós models presenten la mateixa resposta epilèptica que els ratolins B6129-*Prnp*^{0/0}, indicant que cap de les dues formes de PrP^C és capaç d'exercir la funció neuroprotectora. A la PrP^{ΔC4} li manquen el domini central (CD) i el dels *octarepeats* (OR), en canvi, a la PrP^{ΔF35} només el dels OR. Per tant, aquests resultats semblen apuntar que el domini OR absent a les dues construccions seria el responsable d'aquesta neuroprotecció. El tractament amb KA de cèl·lules Neuro2a que expressen formes truncades de la PrP^C ens permeten confirmar els resultats que hem observat *in vivo*. La forma PrP^{ΔCD}, que presenta el domini CD, però no l'OR, és capaç d'exercir la mateixa neuroprotecció que la PrP^C sencera.

L'expressió de formes truncades de la PrP^C en models animals cursa amb neurodegeneració (normalment cerebelar), atàxia, dèficits en la mielinització i mort prematura (Shmerling *et al.*, 1998; Baumann *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). S'ha descrit també que la sobreexpressió de les formes PrP^{ΔCD} i la PrP^{ΔF35} *in vitro* causen mort cel·lular apoptòtica via Caspasa 3 (Vilches *et al.*, 2016). El ratolí *Prnp*^{0/0} ΔC4 mostra un major dany per estrès oxidatiu en un model d'isquèmia que el control *Prnp*^{+/+}. Presenta el mateix fenotip que l'animal genoanul·lat apuntant a què el domini N-terminal que li manca és qui exerceix la funció protectora enfront l'estrès oxidatiu generat per la isquèmia (Mitteregger *et al.*, 2007). Aquest domini N-terminal també s'ha relacionat amb l'activació de la superòxid dismutasa (Sakudo *et al.*, 2003). Tots aquests resultats ens condueixen a pensar que l'absència de la regió OR presenta una dualitat entre la pèrdua de funció protectora i el guany de funció patològica. Amb els nostres resultats no podem discernir si la major susceptibilitat al KA que observem en els models sense el domini N-terminal prové de la pèrdua de funció neuroprotectora de la PrP^C o per la vulnerabilitat del sistema degut a la toxicitat de les formes truncades de PrP^C, però sigui com sigui, l'absència del domini OR incrementa la susceptibilitat al KA.

La PrP^C i la protecció epilèptica

El nostre treball permet consolidar la funció neuroprotectora de la PrP^C enfront la inducció epilèptica per KA. Tot i que hem observat l'efecte dels *Flanking genes* en la modulació epilèptica, els nostres resultats amb el model 129/Ola i *in vitro* ens permeten confirmar-ho. A més, això encaixa amb els resultats obtinguts per altres grups amb models que no estan afectats per aquest fenomen. *In vivo*, amb el peix zebra deficient pel gen homòleg a *Prnp*, *Prp2*, que també presenta més susceptibilitat a l'epilèpsia (Fleisch *et al.*, 2013); i *in vitro* amb cultius primaris on s'ha reduït l'expressió de PrP^C amb un siRNA-*Prnp* (Carulla *et al.*, 2011). En definitiva, hem confirmat una funció de PrP^C que havia generat molta controvèrsia els darrers anys. Hem observat un altre efecte dels *Flanking genes* que dona encara més importància a la cerca de nous models purs *Prnp*^{0/0} que ens permetin desxifrar les funcions de la PrP^C al SNC. A més, hem observat que la PrP^C necessita el domini OR i l'ancoratge GPI per exercir aquesta funció neuroprotectora.

3. L'absència de la PrP^C incrementa l'excitabilitat sinàptica i provoca deficiències en el comportament del nou model ZH3-*Prnp*^{0/0}

La PrP^C s'expressa especialment a la sinapsi (Herms *et al.*, 1999; Um *et al.*, 2012). Com hem descrit en el capítol anterior, una de les funcions sinàptiques de la PrP^C és la neuroprotecció a insults epilèptics com l'àcid kaïníc agonista del glutamat. El següent pas és estudiar la sinapsi *Prnp*^{0/0} per intentar entendre perquè és més susceptible als estímuls epilèptics. En aquest sentit, s'ha descrit que l'absència de la PrP^C provocaria una major excitabilitat sinàptica (Mallucci *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2016), fenomen que podria explicar el aquest fenotip.

Per tant, en aquest darrer capítol de la tesi, ens centrarem en caracteritzar les conseqüències de l'absència de la PrP^C en l'excitabilitat sinàptica del nou ratolí *Prnp*^{0/0}, el model ZH3 (Nuvolone *et al.*, 2016). El nostre treball és el primer que estudia la funció sinàptica de la PrP^C en aquest nou model genoanul·lat amb un fons genètic pur, defugint així de la problemàtica que em observat amb el model B6129 (Nuvolone *et al.*, 2013). La nostra caracterització d'aquest model ha anat més enllà estudiant també l'afectació conductual i cognitiva. La neurotransmissió glutamatèrgica, que s'ha descrit regulada per la PrP^C (Khosravani *et al.*, 2008), és la principal responsable de la connectivitat cortical i la seva disfunció s'ha relacionat amb alteracions conductuals des de l'aprenentatge a l'estrès (Russo and Nestler, 2013). Pensem, per tant, que l'afectació sinàptica de l'absència de PrP^C podria anar més enllà d'una disfunció sinàptica i alterar el comportament i l'aprenentatge en el ratolí genoanul·lat, com treballs previs amb altres models ja han apuntat (Criado *et al.*, 2005; Schmitz *et al.*, 2014b).

El ratolí *Prnp^{0/0}* presenta una reducció de la mobilitat i un comportament ansiós

Observem que els ratolins *Prnp^{0/0}* mostren una mobilitat significativament reduïda al test del camp obert (*Open Field*). Pensem que aquests resultats van més enllà d'una afectació locomotora. La seva tendència a situar-se a la perifèria de l'arena durant el test i el menor nombre d'episodis exploratoris que realitzen apunten a una conducta ansiosa. Aquesta explicaria la reducció de l'activitat ja que l'estrès incrementa l'aversion natural dels ratolins a situar-se en zones exposades, tal com el centre de l'arena en aquesta prova (Carola *et al.*, 2002). Hem inferit també aquest comportament ansiós amb l'elevada defecació dels animals genoanul·lats durant l'habitució per al test de reconeixement d'objectes (Ramos, 2008; Seibenhener and Wooten, 2015). Aquests resultats encaixen amb treballs previs on s'han observat diferents alteracions conductuals en ratolins *Prnp^{0/0}* que es podrien relacionar amb un perfil ansiós/depressiu: dèficits en el test de fabricació del niu (*Nest Building test*) (Schmitz *et al.*, 2014b); reducció de la mobilitat i increment en la latència per iniciar l'exploració en el test del camp obert (Coitinho *et al.*, 2003); i un augment del període de immobilitat en el test de la natació forçada (*Forced swimming test*) i el de la suspensió per la cua (*Tail Suspension test*) (Gadotti *et al.*, 2012).

A la literatura, trobem més d'una quinzena de publicacions que, de forma puntual o exhaustiva, estudien el comportament dels ratolins *Prnp^{0/0}* (Vegeu Schmitz *et al.*, 2014b per a revisió). Les aproximacions són molt diferents per poder fer-ne una bona comparació, però la majoria de treballs descriuen alguna alteració en el comportament o l'aprenentatge en els animals genoanul·lats. Només n'hi ha tres que no mostren cap diferència amb el control. En un d'aquests treballs no es realitza cap test, només es comenta l'observació de l'experimentador sense cap mesura (Manson *et al.*, 1994) i els altres dos no descriuen diferències amb el laberint aquàtic de Morris (*Water Morris maze*) (Büeler *et al.*, 1992; Lipp *et al.*, 1998). Pensem que aquesta falta d'hegemonia en els resultats podria provenir sobretot de l'ús de diferents soques de ratolins i d'aproximacions experimentals. Només un treball realitza estudis de conducta, concretament el laberint circular de Barnes (*Barnes circular maze*), amb el model co-isogènic pur 129/Ola observant dèficits en el temps de latència de resposta i en la memòria espacial (Criado *et al.*, 2005). Tot els altres estan fets amb diferents variants del controvertit model B6129 (Nuvolone *et al.*, 2013). A més, l'estudi de la conducta animal requereix no només d'una praxis molt acurada, sinó del control de moltes variables que poden alterar els resultats. És molt important des de l'estabulació dels animals i el moment del dia de l'experiment, com el sexe i l'edat dels individus d'estudi (Gulinello *et al.*, 2018). El control de totes aquestes variables és important, però pensem que el aquest cas ho és sobretot l'edat de l'animal. Diversos treballs apunten que les

deficiències en el comportament en els ratolins *Prnp^{0/0}* apareixen amb l'edat sigui per dèficits durant el desenvolupament i la maduració del SNC o per l'alteració dels mecanismes de protecció enfront l'envelliment (Rial *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2014a; Massimino *et al.*, 2016).

Disfunció en l'aprenentatge instrumental basat en el condicionament operant en l'animal *Prnp^{0/0}*

El ratolí *Prnp^{0/0}* pressiona significativament menys cops la palanca de la caixa d'Skinner durant el test d'aprenentatge instrumental. A llarg de les 7 sessions, tots els animals control assoleixen el criteri d'aprenentatge de la tasca, en canvi, només ho fan el 69 % dels genoanul·lats. La gran disparitat entre la mobilitat dels dos models podria explicar aquesta diferència, no obstant, els resultats amb el paradigma llum/fosc corroboren que l'alteració rau en un dèficit d'aprenentatge. Resultats no publicats del nostre grup, amb el ratolí B6129-*Prnp^{0/0}*, també mostren deficiències en l'adquisició del condicionament operant amb el test de la caixa d'Skinner. A més, Schmitz i col·laboradors descriuen dèficits en el condicionament per por (Schmitz *et al.*, 2014a).

La memòria associativa basada en el condicionament operant, com el cas del test d'Skinner, implica la integració d'informació de diferents àrees sensorials i motores de l'escorça cerebral on participen tot tipus de mecanismes de plasticitat sinàptica (Hasan *et al.*, 2013). Els dèficits en l'adquisició d'aquest aprenentatge en l'animal *Prnp^{0/0}* implicaria que l'absència de la PrP^C, d'alguna manera, afectaria a la connectivitat i la plasticitat d'aquest complicat sistema.

L'absència de la PrP^C no altera la facilitació sinàptica, però augmenta l'excitabilitat que correlaciona amb una major susceptibilitat epilèptica

La neurotransmissió glutamatèrgica és responsable de la major part de la connectivitat cortical i la seva disfunció s'ha relacionat amb bastantes patologies com la malaltia l'Alzheimer, l'epilèpsia, la isquèmia i, fins i tot, conjuntament amb altres neurotransmissors com el GABA i la dopamina, amb trastorns de l'estat d'ànim com l'estrès crònic i la depressió (Russo and Nestler, 2013). Atès a què la PrP^C s'ha relacionat amb la regulació d'aquesta sinapsi (vegeu Watts *et al.* 2018 per a revisió), hem estudiat la seva plasticitat i excitabilitat en el ratolí *Prnp^{0/0}* per intentar inferir les causes de les alteracions conductuals que hem observat. Concretament, ens hem centrat en les fibres col·laterals de Schaffer de l'hipocamp. És un model molt ben definit de connectivitat glutamatèrgica i gabaèrgica

implicat directament en el condicionament operant, la memòria espacial i la conducta ansiosa (Anacker and Hen, 2017).

L'estudi de la facilitació sinàptica induïda per polsos parells a la via col·lateral de Schaffer ens indica que la sinapsi *Prnp*^{0/0} es comporta igual que la control. L'absència de la PrP^C, com a mínim amb la nostra aproximació, no afecta a la facilitació sinàptica. Aquest mecanisme sinàptic depèn sobretot de l'augment de la probabilitat de fusió de les vesícules de neurotransmissors a nivell presinàptic (Jackman and Regehr, 2017). Tot i que s'ha descrit que la PrP^C també s'expressa al terminal presinàptic (Herms *et al.*, 1999), fins al moment, la seva funció s'ha relacionat amb mecanismes postsinàptics com la regulació dels receptors d'NMDA (Khosravani *et al.*, 2008), dels d'AMPA (Watt *et al.*, 2012) i del canal de K⁺ Kv 4.2 (Mercer *et al.*, 2013). Per tant, sembla que la PrP^C desenvolupa el seu paper sobretot en la part postsinàptica del terminal, encaixant amb la manca d'afectació de la facilitació sinàptica regulada a l'altra part del terminal.

En canvi, hem observat que les fibres col·laterals de Schaffer *Prnp*^{0/0} mostren una elevada excitabilitat sinàptica en ser estimulades a alta intensitat. Si ens fixem en la ràtio dels polsos parells (PP) de la connexió *Prnp*^{+/+}, observem que a intensitats baixes es va incrementant seguint una tendència ascendent, indicant una facilitació per PP (PPF), no obstant, a partir de 0,16 mA comença a decaure ja que experimenta depressió per PP (PPD). Aquest fenomen es considera un mecanisme homeostàtic per protegir el sistema enfront estímuls repetitius i d'alta intensitat potencialment excitotòxics (Madrónal *et al.*, 2009). En canvi, en el cas de la connexió *Prnp*^{0/0}, la ràtio de PPD no comença fins a intensitats més elevades (0,26 mA) i no arriba a nivells de la control. A més, si ens fixem en les dades crues de la corbes fEPSPs, observem que la resposta al segon pols (fEPSP2) és significativament major que la del primer (fEPSP1) a intensitats elevades. Per tant, l'absència de la PrP^C sembla provocar la pèrdua d'aquest mecanisme homeostàtic de protecció enfront estímuls d'alta intensitat ja que la facilitació sinàptica no minva.

Aquesta alteració explicaria també que l'animal genoanul·lat sigui més susceptible a la inducció epilèptica per KA. La sinapsi presenta un funcionament aparentment normal, però en rebre inputs d'elevada intensitat, com pot ser una dosi elevada i repetida de KA o una estimulació d'alta intensitat, no és capaç de mantenir l'homeòstasi provocant una resposta exacerbada que, fins i tot, acaba amb la mort neuronal com veiem amb la tinció de Fluor Jade B a la capa piramidal de CA1-CA3. Seguint aquesta idea, vam registrar la via col·lateral de Schaffer després de l'administració de KA (8 mg/kg i.p.) en els mateixos animals *Prnp*^{0/0} i *Prnp*^{+/+} (dades no mostrades). Vam observar que el doble d'animals *Prnp*^{0/0} sofrien crisis espontànies (~40% enfront ~20%) i que el nombre de crisis sofertes per animal era major (0,8 enfront 0,25 crisis/animal), tot i que no significativament ($p = 0,10$). Aquests

resultats encaixen amb el que hem observat amb el fenotip epilèptic *in vivo*. Pensem que elevant la dosi de KA probablement sí que observariem diferències significatives amb el control. Finalment, l'observació d'aquest fenotip també en el nou model ZH3-*Prnp*^{0/0} corrobora les dades que hem descrit en el segon capítol d'aquesta tesi sobre la funció neuroprotectora de la PrP^C. El fenotip epilèptic de l'animal ZH3-*Prnp*^{0/0} s'assembla al de l'únic altre model genoanul·lat co-isogènic pur, el 129/Ola-*Prnp*^{0/0}.

S'han descrit diferents afectacions a la sinapsi *Prnp*^{0/0} que ens permetrien explicar la seva elevada excitabilitat. Una de les més rellevants és la reducció de la hiperpolarització lenta posterior (sAHP) a les neurones piramidals de la CA1 (Colling *et al.*, 1996; Mallucci *et al.*, 2002). El potencial de membrana postsinàptic queda despolaritzat després d'un potencial d'acció, però quan el terminal rep un tren de potencials d'acció consecutiu, la hiperpolarització s'allarga generant l'sAHP. Aquesta hiperpolarització perllongada és un mecanisme de protecció enfront l'activació excessiva i la possible excitotoxicitat derivada degut a l'entrada massiva de Ca²⁺ ja que allunya el potencial de membrana postsinàptic del llindar d'activació cosa que frena la generació de nous potencials d'acció (Sah and Davies, 2000). Aquesta reducció s'ha descrit en animals genoanul·lats per la PrP^C i es pensa que prové de la reducció de canals de Ca²⁺ dependents de voltatge (VGCCs), actors principals en la despolarització (Senatore *et al.*, 2012). En aquest sentit, altres treballs han descrit que la PrP^C redueix l'entrada massiva de Ca²⁺ després de l'estimulació amb agonistes del glutamat (De Mario *et al.*, 2017).

Hem descrit la susceptibilitat dels animals *Prnp*^{0/0} a l'àcid kaínic, però no sabem la relació que hi ha entre l'acció d'aquest agonista glutamatèrgic i l'absència de la PrP^C. La resposta a aquesta pregunta no està totalment clara, però s'han descrit evidències de que la PrP^C regularia directament l'expressió i la funcionalitat dels receptors de KA. El nostre grup va descriure que les subunitats dels receptors de KA, GluK1 i GluK2, estaven sobreexpressades a l'hipocamp dels ratolins *Prnp*^{0/0} (Rangel *et al.*, 2007) i que la PrP^C s'hi unia directament (Carulla *et al.*, 2011). Per tant, tant a nivell transcripcional com a nivell d'interacció, sembla que la PrP^C estabilitzaria la funció dels receptors de KA, però ho hauríem de corroborar amb el nostre model.

Però, quines funcions exerceixen els receptors de KA que la seva desregulació ocasionaria una elevada excitabilitat? Aquests receptors s'expressen al llarg de tot el SNC, però sobretot a algunes sinapsis concretes com la de les fibres molles cap a CA3 i la de les fibres col·laterals de Schaffer. Concretament, s'ha descrit que la subunitat GluK1 s'expressa notòriament a les neurones piramidals de la CA1-CA3 i la GluK2 a les interneurons hipocàmiques (Lerma and Marques, 2013). Aquesta expressió localitzada és la responsable de la mort neuronal a la capa piramidal CA1-CA3 típica dels models

experimentals d'epilèpsia (Vincent and Mulle, 2009). A més, s'han descrit que participen en dos mecanismes per protegir la sinapsis de l'excitotoxicitat. Per una banda, s'ha observat que la baixada de Na^+ a la fenedura sinàptica degut a una arribada elevada de potencials d'acció els inhibeix, ja que necessiten la unió al·lostèrica amb el Na^+ per activar-se. Aquest mecanisme evita l'obertura excessiva d'aquests receptors prevenint l'excitotoxicitat (Plested and Mayer, 2007). L'altre mecanisme és la modulació de la sinapsi de GABA a les interneurons de la regió CA1. Els receptors de KA s'expressen al terminal presinàptic gabaèrgic i, mitjançant l'activació de missatgers secundaris i proteïna G com si d'un canal metabotrópic es tractés, regulen l'alliberació de GABA (Rodríguez-Moreno *et al.*, 1997). Atès a aquestes funcions dels receptors de KA, suggerim que la seva alteració degut a l'absència de la PrP^{C} ocasionaria l'elevada excitabilitat que observem tant electrofisiològicament com amb l'administració de KA.

Les fibres col·laterals de Schaffer *Prnp*^{0/0} no generen potenciació a llarg termini

El protocol d'estimulació d'alta freqüència (HFS) no aconsegueix la inducció de potenciació a llarg termini a l'animal *Prnp*^{0/0}. Aquests resultats posen una mica de llum en una qüestió també controvertida. L'ús de múltiples models tant animals com experimentals per estudiar l'LTP ha fet complicada la concreció de la funció de la PrP^{C} en aquest mecanisme. Alguns treballs apunten que la inducció de la LTP en els animals genoanul·lats és exagerada (Rangel *et al.*, 2009), normal (Lledo *et al.*, 1996), o només la redueix en edats avançades (Curtis *et al.*, 2003). En canvi, altres publicacions descriuen que la impossibilita, tal com mostren els nostres resultats (Collinge *et al.*, 1994; Manson *et al.*, 1995; Criado *et al.*, 2005).

L'LTP és un mecanisme de plasticitat sinàptica que depèn de l'activació dels receptors d'NMDA. Aquesta, a través de l'entrada de Ca^{2+} , activa vies de senyalització, principalment la CaMKII, que modulen el terminal sinàptic, entre d'altres coses reclutant nous receptors d'AMPA (Herring and Nicoll, 2016). El paper concret de la PrP^{C} en aquest mecanisme és desconegut, però pensem que podria regular l'activitat dels receptors i atès a que s'ha descrit que estabilitza i interactua amb la subunitat GluN2D dels receptors d'NMDA (Khosravani *et al.*, 2008) i les subunitats GluA1 i GluA2 dels d'AMPA (Watt *et al.*, 2012). L'elevada excitabilitat i les crisis epilèptiques observades després de l'HFS en la majoria dels animals genoanul·lats també podria explicar l'absència de potenciació. Les crisis epilèptiques no severes generen canvis moleculars i cel·lulars a la sinapsi similars als necessaris per induir l'LTP. Això, d'alguna manera, sobreactiva el sistema impeding la inducció de l'LTP després de l'HFS (Reid and Stewart, 1997; Meador, 2007).

Cultius neuronals corticals *Prnp*^{0/0} mostren una disminució de la seva activitat síncrona i de la formació de xarxes

L'absència de la PrP^C, tal com hem explicat, genera una sinapsi amb una elevada excitabilitat que tendeix fàcilment a sofrir episodis epilèptics. L'epilèpsia, a grans trets, és una alteració de l'equilibri entre la neurotransmissió excitatòria i la inhibidora degut a factors genètics i adquirits. Aquest desequilibri pot ser causat per alteracions en la connectivitat del cervell a conseqüència de dèficits durant el desenvolupament, traumes o infeccions (Stafstrom and Carmant, 2015). Segons això, el nostre següent pas va ser estudiar les conseqüències de l'absència de la PrP^C en la maduració i la connectivitat neuronal *in vitro* per descriure si això podia explicar el fenotip que hem observat. Observem clarament que els cultius genoanul·lats presenten una maduració i connectivitat neuronal deficientes amb un nombre reduït d'activacions síncrones (*burst*).

S'ha descrit que la PrP^C regula positivament la diferenciació neuronal *in vitro* i *in vivo* a l'hipocamp (Steele *et al.*, 2006) i al bulb olfactiu (Parrie *et al.*, 2018) dels ratolins. Inclús s'ha observat que la seva expressió augmenta al llarg del desenvolupament del SNC en humans (Adle-Biassette *et al.*, 2006). A més, s'ha relacionat amb la formació de noves neurites (Loubet *et al.*, 2011) i, a través de la seva unió homofílica PrP^C-PrP^C, en al seva guia i creixement *in vitro* (Amin *et al.*, 2016). Nosaltres mateixos, en el primer capítol d'aquesta tesi, observem un endarreriment en la diferenciació de les iPSC amb la mutació Y218N, apuntant també en aquest sentit. Per tant, pensem que la carència de la PrP^C provoca dèficits en la diferenciació i maduració de les xarxes neuronals tan *in vitro* com *in vivo* que provocarien aquesta baixa sincronia en el cultiu.

PrP^C: excitabilitat, connectivitat i modulació de la conducta

En aquest capítol, hem caracteritzat a nivell conductual i sinàptic per primer cop el model ZH3-*Prnp*^{0/0}. S'ha considerat el model "definitiu" per estar generat sota un fons genètic pur, i sobretot, per haver-se realitzat amb una mínima afectació del genoma. Hem descrit que aquest model genoanul·lat presenta dèficits en el condicionament operant i una reducció notòria de la seva activitat que relacionem amb un comportament ansiós. Coincidint amb resultats previs descrits amb altres models, observem una elevada excitabilitat, una major susceptibilitat a l'epilèpsia i la manca d'inducció d'LTP. Aquest fenotip semblaria provenir d'una manca de connectivitat i la maduració endarrerida que hem descrit *in vitro*.

El deteriorament cognitiu és un dels primers símptomes de les Prionopaties (Caine *et al.*, 2015) i una proporció notòria de pacients sofreixen crisis epilèptiques. L'epilèpsia i les alteracions cognitives com la depressió i l'ansietat es presenten comòrbides en molts de pacients (Kanner, 2011). S'ha descrit una relació directe entre l'estrès, via glucocorticoides, i la neurotransmissió glutamatèrgica (Popoli *et al.*, 2011) i s'han observat comportaments depressius en models experimentals d'epilèpsia (Medel-Matus *et al.*, 2017). A més, s'han observat alteracions en el nivell d'expressió de la PrP^C en pacients d'esquizofrènia, trastorn bipolar, depressió (Weis *et al.*, 2008) i trastorn de la conducta (Dean *et al.*, 2018), indicant que podria participar en la patologia. Per tant, podríem pensar que l'elevada excitabilitat neuronal dels animals genoanul·lats podria explicar no només la simptomatologia epilèptica, sinó també les alteracions en el comportament i l'aprenentatge. La relació entre la PrP^C, l'excitabilitat sinàptica i els dèficits cognitius ja va ser postulada per Gadotti i col·laboradors. Observen que l'animal *Prnp*^{0/0} es recupera del seu comportament semblant a la depressió en el test de la suspensió de la cua després d'administrar-li l'inhibidor glutamatèrgic MK-801 (Gadotti *et al.*, 2012). Encaixant amb el que acabem de comentar, els nostres ratolins genoanul·lats semblen presentar una conducta anhedònica segons resultats preliminars amb el test de preferència a sacarosa. I també hem observat, tot i que els resultats no són del tot fiables degut a la baixa interacció dels animals *Prnp*^{0/0}, diferències significatives en el test de reconeixement d'objectes, i per tant, en la memòria episòdica.

Més enllà de l'excitabilitat, pensem que és important remarcar també l'alteració de la maduració i connectivitat neuronal observada en el cultiu genoanul·lat ja que podria explicar part del deteriorament cognitiu. Encaixant amb aquesta idea, Salazar i col·laboradors van estudiar el paper de la PrP^C amb la toxicitat derivada de l'A β a estadis avançats de la patologia. Amb aquest propòsit, van eliminar condicionalment l'expressió de la PrP^C als 12 i 16 mesos d'edat en els ratolins APP/PS1-flox*Prnp*-Cre i van observar que la deleció de la PrP^C recuperava el deteriorament cognitiu degut a l'expressió de l'APP/PS1 (Salazar *et al.*, 2017). En el nostre cas ens interessa fixar-nos amb els resultats que obtenen amb els animals APP/PS1^{0/0}-flox*Prnp*-Cre⁺. Observen que la deleció de la PrP^C en una edat avançada no altera les seves capacitats cognitives. Atès a això, tindria sentit pensar que les deficiències cognitives que nosaltres descrivim podrien provenir d'alteracions durant el desenvolupament, ja que el nostre model genoanul·lat és constitutiu.

4. La PrP^C, bastida sinàptica amb múltiples acompanyants

La proteïna priònica cel·lular s'expressa al terminal sinàptic, sobretot als raïls lipídics (Taylor and Hooper, 2006). Els raïls lipídics, com tot el terminal, són estructures amb una gran quantitat de proteïnes que interaccionen de forma molt regulada i controlada per permetre la formació de la sinapsi i la neurotransmissió. Entenem la PrP^C com una proteïna clau en aquest sistema, convertint-se amb una bastida extracel·lular ancorada a la membrana que regula la funcionalitat d'altres proteïnes. L'interactoma de la PrP^C és molt extens: 1) subunitats de receptors glutamatèrgics ionotòpics, la GluN2D (Khosravani *et al.*, 2008), la GluA1, la GluA2 (Watt *et al.*, 2012) i la GluK2 (Carulla *et al.*, 2011); 2) receptors metabotòpics de glutamat tipus I (Beraldo *et al.*, 2011); 3) canals iònics dependents de voltatge, el Kv4.2 (Mercer *et al.*, 2013) i el VGCC (Senatore *et al.*, 2012); 4) cations divalents, el Cu²⁺ (Brown *et al.*, 1997), el Zn²⁺ (Walter *et al.*, 2007) i el Mn²⁺ (Brazier *et al.*, 2008); 5) proteïnes d'adhesió cel·lular, l'NMCA1 (Santucci *et al.*, 2005) i la integrina $\beta 1$ (Loubet *et al.*, 2011); 6) altres receptors com l'EGFr (Llorens *et al.*, 2013b) i Notch (Hirsch *et al.*, 2018); i 7) agregats amiloides d'A β (Lauren *et al.*, 2009) i d' α -sinucleïna (Urrea *et al.*, 2018).

Totes aquestes proteïnes, complexes i ions amb què interactua la PrP^C es troben a l'espai extramembrana, encara que s'ha descrit que la PrP^C regula vies de senyalització citoplasmàtiques, tot i que la proteïna madura s'expressa a l'espai extracel·lular ancorada a la membrana i no té cap domini intracel·lular. La considerem una proteïna lligand que actua com a medidora de senyals externs actuant sobre altres proteïnes (Hirsch *et al.*, 2017; Wulf *et al.*, 2017). Per exemple, s'ha descrit que la PrP^C canalitza la toxicitat dels oligòmers d'A β i dels propis prions a través de la seva interacció amb el receptor mGluR5 (Um *et al.*, 2013; Goniotaki *et al.*, 2017). També que la PrP^C regula la neuritogènesi activant la via RhoA/LIMK/cofilina unint-se a la Integrina $\beta 1$ (Loubet *et al.*, 2011). Per tant, la interacció amb altres proteïnes és indispensable per la seva regulació de vies de senyalització intracel·lulars i això li confereix la capacitat d'incidir en processos que no estan al mateix compartiment cel·lular.

Recentment, s'ha descrit que no tota la PrP^C es processaria igual i algunes formes minoritàries (~1-10 %) adquiririen conformacions transmembrana durant el trànsit vesicular des del reticle endoplasmàtic, i inclús hi hauria una forma citoplasmàtica (CytPrP^C). Aquesta isoformes poden tenir el C-terminal de cara al lumen de la vesícula (C_{tm}PrP^C) o al citoplasma (N_{tm}PrP^C) (Mironov *et al.*, 2003; Emerman *et al.*, 2010). A partir d'aquest descobriment, han aparegut alguns treballs que apunten a què aquestes formes tindrien funcions específiques que podrien, en part, ser responsables de la regulació intracel·lular de la PrP^C. Per exemple, s'ha descrit que aquestes espècies s'uneixen a la proteïna Argonauta (Argo), que participa en el processament dels ARNm micro al citoplasma (Gibbings *et al.*, 2012). S'ha postulat també que podrien incidir en la toxicitat a les Prionopaties (Song *et al.*, 2013). L'aparició d'aquesta línia en l'estudi de la PrP^C, tot i que encara està començant, obre la porta a entendre moltes funcions descrites per aquesta proteïna i a entendre que el seu paper vagi més enllà de la sinapsi. En el nostre cas no tenim cap informació per descartar o no el paper d'aquestes formes minoritàries.

Atès a aquest ampli interactoma i a la importància de la seva acció conjunta amb altres proteïnes, és fàcil pensar que la deleció o mutació de la PrP^C ocasioni un ventall tant dispers d'alteracions. Per exemple, tal com hem descrit en aquesta tesi, des de la regulació de la proteïna Tau, a la neuroprotecció epilèptica, l'excitabilitat sinàptica i el comportament. Per una altra banda, les funcions a les que s'ha relacionat la PrP^C són essencials per al bon desenvolupament del sistema nerviós i probablement existeixen mecanismes de compensació que poden sobreposar-se a l'absència de la PrP^C, i, per tant, emascarar les conseqüències de la seva deleció o mutació en els models genoanul·lats. Seguint aquesta línia, trobem el treball de Young i col·laboradors. Observen que la doble deleció de *Prnp* i del gen *Sprn*, que codifica per la proteïna Shadoo (homòloga a la PrP^C), provoca letalitat embrionària, però no ho fa només la deleció d'un dels dos gens. Postulen que aquests gens regularien funcions paral·leles durant el desenvolupament embrionari compensant-se entre ells si un falla (Young *et al.*, 2009). Aquests mecanismes de compensació, pensem que podrien ser el motiu pel qual necessitem forçar el sistema per observar diferències entre l'animal d'expressió salvatge i el genoanul·lat. En el segon capítol, necessitem administrar una dosi elevada de KA (3x10 mg) per observar el fenotip epilèptic i, en el tercer, no observem cap alteració en l'excitabilitat ni la facilitació sinàptica fins que estimulem a una elevada intensitat. Postulem que aquests mecanismes de compensació sostindrien el sistema en un estat basal, però sucumbirien en situacions d'estrès i d'elevada intensitat. En aquest sentit, a la literatura trobem varis estudis de la conducta del ratolí *Prnp*^{0/0} que només observen alteracions a edats avançades de l'animal (Coitinho *et al.*, 2003; Curtis *et al.*, 2003; Massimino *et al.*, 2016). Considerem que aquests treballs en serien un exemple, mentre el sistema és "jove" i capaç de compensar la manca de la PrP^C no hi ha disfuncions,

en canvi, quan envelleix i els mecanismes de reparació comencen a ser menys eficients, apareixen les alteracions.

Amb tot aquest context, en la present tesi hem estudiat les funcions fisiològiques de la PrP^C en diferents àmbits, però que convergeixen en un mateix marc. Amb els nostres resultats i la literatura hem dissenyat un model de les funcions de la PrP^C que aquí hem abordat (Figura 15). Per una banda, participaria en la fosforilació i l'*splicing* alternatiu de la proteïna Tau (Figura 15A). Així, en les neurones derivades de les iPSC procedent del pacient de la GSS, la mutació Y218N desregularia l'equilibri de fosforilació i desfosforilació de Tau i el seu *splicing* alternatiu. L'augment de la p-Tau i/o l'increment de les isoformes Tau 3R reduiria l'afinitat de les dineïnes i kinesines als microtúbuls alterant el trànsit mitocondrial (Figura 15B). Un treball *in silico* descriu detalladament les conseqüències d'aquesta mutació en l'estructura tridimensional de la proteïna, postulant que implicarien importants alteracions en la seva funció (Cheng and Daggett, 2014). Tot i que no sabem a través de quina via de senyalització, la mutació de la PrP^C modificaria la seva modulació aigües avall de la proteïna Tau. S'ha descrit prèviament que la PrP^C regula l'activitat de Fyn i l'expressió de la Cdk5, ambdues relacionades amb la fosforilació de Tau (Benvegnu *et al.*, 2011; Larson *et al.*, 2012), mecanisme que podria afectar en el nostre sistema. Pel que fa a l'*splicing* alternatiu, el nostre grup està seguint una línia experimental basada en la regulació de la PrP^C d'alguns ARNmicro i de l'*splicing*. Aquesta idea és basa amb la interacció descrita de la PrP^C amb la proteïna Argo, encarregada del processament dels ARNmicro (Gibbins *et al.*, 2012). Tant alguns ARNmicro com la pròpia Argo s'han relacionat amb la regulació de l'*splicing* alternatiu, per tant podrien explicar els nostres resultats (Hébert *et al.*, 2012; Batsche and Ameyar-Zazoua, 2015).

En un segon terme, la PrP^C regula el desenvolupament neural participant en la proliferació i neurogènesi (Steele *et al.*, 2006; Prodromidou *et al.*, 2014), la diferenciació neuronal (Steele *et al.*, 2006) i la formació sinàptica (Amin *et al.*, 2016). Els nostres resultats d'imatge de Ca²⁺ *in vitro* demostren que la PrP^C participa en la formació de xarxes i la connectivitat (Figura 15C). També hem observat a les iPSC-Y218N un endarreriment en la diferenciació neuronal que podríem relacionar amb la disfunció de la PrP^C directament, o indirectament a través de la regulació de l'*splicing* de Tau, ja que l'elevada expressió de les isoformes 3R potser causa o efecte de l'estancament en la diferenciació neuronal (Figura 15D). I en tercer lloc, la PrP^C a nivell sinàptic, com hem comentat abans, participa en la regulació de diferents receptors glutamatèrgics, proteïnes d'ancoratge, proteïnes d'adhesió cel·lular i en l'homeòstasi del coure (Vegeu Wulf *et al.*, 2017 per a revisió) (Figura 15E). Aquestes funcions a nivell sinàptic afecten directament també al desenvolupament neural (Figura 15F).

Un cop descrites les funcions de la PrP^C, desxifrem les conseqüències de la seva absència en els nostres models *Prnp*^{0/0} (Figura 15G). En aquesta tesi no hem mirat com afecta a l'expressió i funcionalitat de la Tau l'absència de la PrP^C. No podem descartar que part de les alteracions descrites en els nostres models genoanul·lats provingui d'una desregulació de Tau (Figura 15H). Sorprenentment, s'ha publicat que els ratolins *Mapt*^{0/0} són resistents a la inducció epilèptica per KA, indicant que la proteïna Tau podria tenir un paper en la susceptibilitat a l'epilèpsia (Pallo *et al.*, 2016). Per tant, si els nostres ratolins *Prnp*^{0/0} presentessin alguna alteració a Tau, aquesta podria influir també en el seu fenotip epilèptic.

Els nostres resultats mostren una elevada excitabilitat sinàptica i deficiències en la connectivitat. Dintre d'aquest fenotip també incloem la reducció de la capacitat de resposta a estrès cel·lular com s'ha descrit en models d'isquèmia (Beraldo *et al.*, 2018) i d'hipòxia (Ramljak *et al.*, 2015) (Figura 15I). Aquests fenotip provoca que l'animal genoanul·lat sigui més susceptible a sofrir episodis epilèptics degut a l'administració d'àcid kaínic, tal com hem descrit al segon capítol, i a les estimulacions elèctriques repetides d'alta intensitat, com hem observat en el tercer (Figura 15J). No s'indueix LTP en l'animal *Prnp*^{0/0} (Figura 15K). Pensem que pot ser perquè els mecanismes necessaris per aquesta inducció fallin ja que la PrP^C hi participa directament, com per la seva regulació dels receptors d'NMDA (Khosravani *et al.*, 2008) i/o del reclutament de nous receptors d'AMPA (Watt *et al.*, 2012). No podem descartar tampoc, que sigui degut a l'elevada excitabilitat del sistema. Finalment, els dèficits d'LTP i l'excitabilitat generarien un sistema que afectaria al comportament de l'animal. Aquest presenta una conducta ansiosa i pseudo-depressiva, una reduïda activitat i no és capaç d'aprendre tasques com el condicionament operant (Figura 15L).

Abans d'acabar aquest apartat, creiem que és important posar en relleu què hem caracteritzat nous models per estudiar aquest ampli repertori de funcions de la PrP^C. El primer model neuronal *in vitro* provinent directament d'un pacient de Prionopatia que ens permetrà estudiar també la Taupatia. En segon lloc, hem demostrat l'efecte dels *Flanking genes* en el model murí més utilitzat, el ZH1, replantejant, com altres ja havien fet, la seva validesa. Finalment, hem caracteritzat un nou model de ratolí, el ZH3, que ens permetrà sobreposar-nos a aquesta controvèrsia de models i estudiar nítidament les funcions de la PrP^C.

Aquest ampli repertori de funcions que descrivim reforcen la idea en què vàrem començar aquesta tesi doctoral. Estudiar la fisiologia de la PrP^C endògena per entendre millor la patologia de les Prionopaties ja que la seva expressió es veu reduïda en el SNC dels pacients. Tot aquest ventall de simptomatologia que hem observat *in vitro* i *in vivo* es produeix a banda de la generació de PrP^{Sc} i de la seva agregació, posant sobre la taula

només, les conseqüències de l'absència o la mutació de la PrP^C. El deteriorament cognitiu i les crisis epilèptiques són dos símptomes d'aquestes malalties que, extrapolant els nostres resultats, podríem pensar que, potser, són conseqüència, en part com a mínim, de la pèrdua de la PrP^C. Actualment, s'estan plantejant tractaments dirigits contra la PrP^C endògena per evitar el seu plegament anòmal i l'agregació amb anticossos o molècules anti-prions (Polymenidou *et al.*, 2004; Diaz-Espinoza *et al.*, 2018). Observant els nostres resultats i el que aquí hem resumit de la literatura, pensem que és molt important aprofundir en els efectes de l'eliminació de la PrP^C endògena per assegurar-nos que aquests tractaments no tinguin uns efectes secundaris molt dràstics contraproduents.

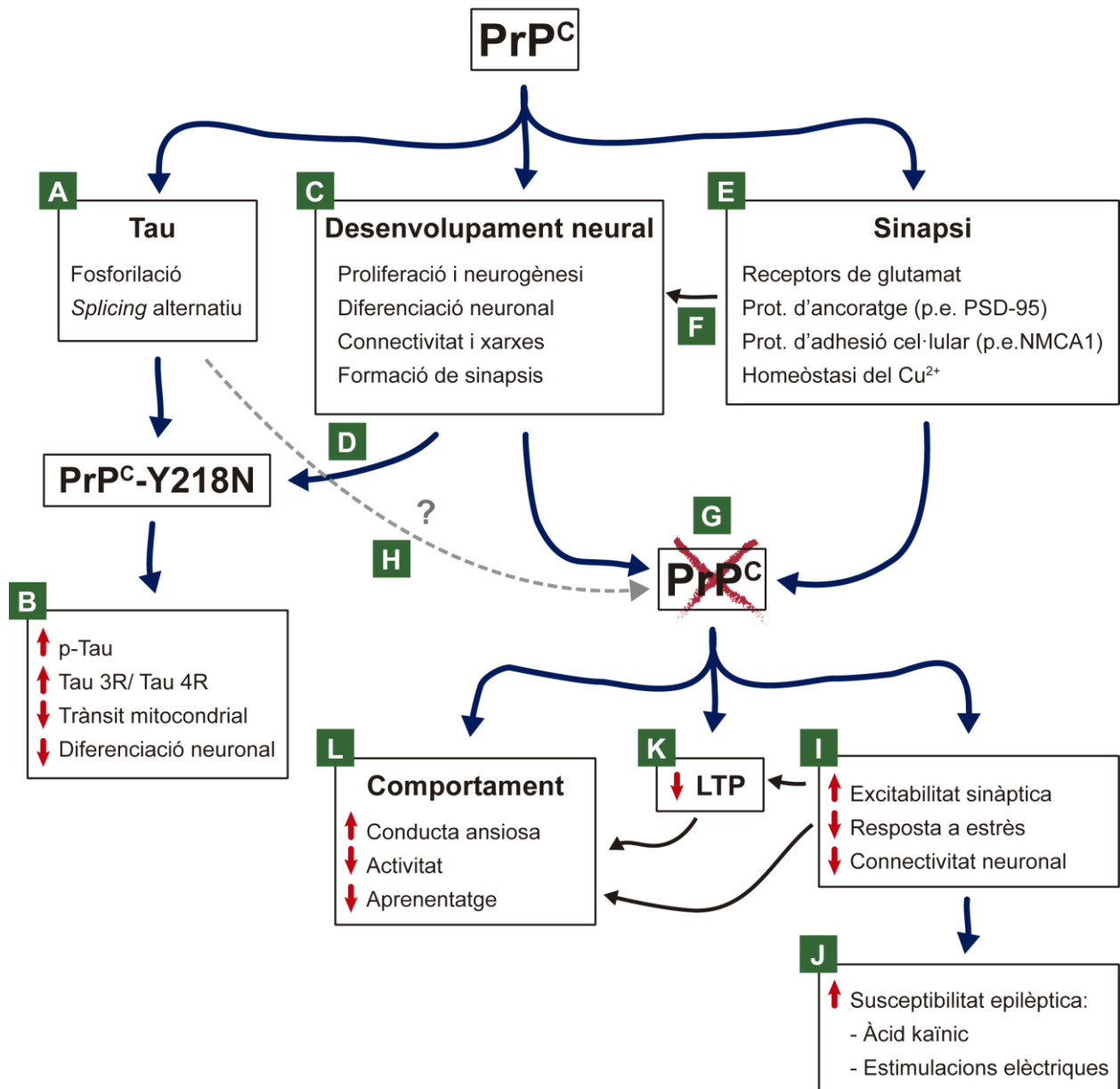


Figura 15: Esquema conceptual resumint els resultats obtinguts en aquesta tesi.

5. Perspectives de futur en l'estudi de la PrP^C

Tot i que han passat quatre dècades des del descobriment del prió, encara ens falta molt camí per poder donar una resposta als pacients. És molt important aprofundir en el coneixement de la biologia de la PrP^C per poder dissenyar i plantejar els tractaments del futur. Amb aquest objectiu, en aquest apartat explicarem com hauria de continuar el projecte més enllà d'aquesta tesi.

En primer lloc, parlarem de les iPSC que hem generat i caracteritzat. Són una eina prometedora en l'estudi de la relació entre PrP^C i Tau, així com de la comorbiditat Prionopatia-Taupatia. Per una banda, considerem que seria interessant aconseguir la generació de la PrP^{Sc} per obtenir el primer model neuronal que espontàniament reproduís la Prionopatia. En aquest sentit, pensem que una aproximació 3D amb organoïdes podria propiciar l'acumulació de PrP^{Sc} tal com s'ha descrit amb iPSC derivades de pacients d'Alzheimer familiar (Raja *et al.*, 2016) o reprogramades amb per expressar l'ApoE4 (Lin *et al.*, 2018). En aquests casos s'observen clarament agregats d'Aβ. Tenint en compte que la GSS és una Prionopatia de progressió lenta, potser necessitaríem afegir algun estrès cel·lular per induir la generació de la PrP^{Sc}. Tal com s'ha descrit amb l'AD, l'activitat neuronal induïx la generació d'Aβ ja que propicia el processament de l'APP per la via amiloidogènica (Das *et al.*, 2013). Per tant, pensem que l'activació forçada de les neurones amb algun mecanisme optogenètic o amb agonistes podria propiciar la generació de PrP^{Sc}. Tot i això, potser la quantitat de PrP^{Sc} que es formaria no seria detectable amb el sistema de detecció convencional amb proteïnasa K i hauríem d'analitzar les mostres amb un sistema d'amplificació de proteïna mal plegada *ex vivo*, com l'RT-QuIC o el PCMA. Pensem que amb aquests tres canvis es podria generar espontàniament PrP^{Sc} i obtenir el primer model de la patologia *in vitro*.

Per una altra banda, també seria interessant estudiar el mecanisme pel qual la mutació de la PrP^C ocasiona un augment de la fosforilació de Tau i un desequilibri en el seu *splicing* alternatiu. Aquesta descripció podria ajudar a entendre la patologia de totes les Taupaties més enllà de la GSS. Nosaltres vam mirar l'activitat de la GSK3 i no vam veure cap diferència amb el control, per tant, la regulació ha d'anar per alguna de les altres cinases o

fosfatases que participen en l'equilibri fosforilació/desfosforilació de Tau. Per tant, s'haurien de fer assajos d'activitat de la Cdk5, Fyn i la PP2A, entre altres, i després anar desengranant els actors que hi participen. Pensem que seria molt important descriure a través de quina proteïna o complex la PrP^C regula aquesta via per poder incidir-hi directament. Amb aquesta fi realitzaríem assajos de co-immunoprecipitació de la PrP^C-Y218N per desxifrar el seu interactoma. Seguint amb la proteïna Tau, hem comentat en l'apartat anterior que no podem descartar que en el nostre model *Prnp*^{0/0} també estigui alterada. Aquesta línia experimental s'està duent a terme al nostre grup amb resultats preliminars prometedors observant alteracions en l'*splicing* alternatiu de Tau en el SNC del ratolí genoanul·lat.

El següent pas és aprofundir en la descripció dels mecanismes que provoquen les alteracions en l'excitabilitat i la connectivitat que hem observat en l'animal ZH3-*Prnp*^{0/0}. Actualment estem realitzant experiments per quantificar la neurogènesi hipocàmica i les espines dendrítiques de la CA1 amb una tinció de Golgi. Aquests experiments ens permetran estudiar la generació i incorporació de noves neurones, i el nombre i morfologia dels botons sinàptics que podria relacionar-se amb la seva excitabilitat sinàptica. També tenim programada una bateria de tests conductuals (test de suspensió de la cua, test de preferència a la sacarosa i el test de la natació forçada) per descriure en més detall el fenotip ansiós/depressiu en l'animal genoanul·lat. Ens permetran dirimir totalment entre l'afectació locomotora i la cognitiva. Finalment, hem realitzat una seqüenciació d'ARN total de l'hipocamp de ratolins *Prnp*^{0/0} i *Prnp*^{+/+}. Els resultats preliminars de l'ontologia genètica són prometedors. Tot i que encara hem de validar els resultats, han aparegut desregulats sistemes que podrien explicar els fenotip com l'alteració de receptors de neurotransmissors (*Gabra2*, *GluN2B* i *Adora2B*), proteïnes de dinàmica sinàptica (*Cav3* i *Syn3*), proteïnes reguladores de la maduració de l'ARNm com *CPEB4*, i sorprenentment, enzims del metabolisme oxidatiu (*Ldhd*, *Eno1b* i *Cox14*).

La informació de la seqüenciació de l'ARN sembla que obrirà les portes a noves línies d'investigació interessants si es confirmen aquestes dades preliminars. Per primer cop es relacionaria la PrP^C amb el metabolisme de la glucosa al cervell, tant important en aquest òrgan. La neurona no tindria només afectació a nivell sinàptic, sinó també problemes energètics. Ens crida l'atenció l'alteració del receptor gabaèrgic *Gabra2* que ens permetria enfocar l'elevada excitabilitat també a una alteració de la inhibició, encaixant amb altres treballs que descriuen que els animals *Prnp*^{0/0} també són susceptibles a la inducció epilèptica amb PTZ (Fleisch *et al.*, 2013). Amb la recerca de les funcions d'aquests gens, hem descobert una malaltia del desenvolupament minoritària, l'encefalopatia *Grin2B*, causada per mutacions al gen *GluN2B* (recordem que *Grin2B* i *GluN2B* es refereixen al

mateix gen). S'han descrit només un centenar de casos, però tots cursen amb dèficits intel·lectuals, síndrome de l'espectre autista i epilèpsia. També s'han observat deficiències locomotores i de la vista i malformacions corticals similars (Platzer *et al.*, 2017; Platzer and Lemke, 2018). A més, l'alteració de la proteïna reguladora de la poliadenilació CPEB4 s'acaba de relacionar amb l'autisme (Parras *et al.*, 2018). Si confirmem aquests resultats, pensem que seria massa casualitat que el nostre animals genoanul·lat presentés símptomes molt similars als dels pacients de l'encefalopatia *Grin2B* i alguns trets semblants a l'autisme, i que tinguin els mateixos gens desregulats sense haver-hi cap relació. Clarament, intentàrem obtenir més dades sobre aquestes malalties per estudiar la si la PrP^C hi té també alguna relació i si les alteracions que les causen també afecten al nostre model genoanul·lat.

El que acabem de comentar és la continuació del projecte actual. No obstant, ens interessaria anar més enllà i posar sobre el paper també noves línies d'investigació en el camp. Per una banda hem observat i descrit alteracions en el desenvolupament i la diferenciació neuronal en els models *Prnp*^{0/0}, però no s'ha fet encara una caracterització detallada, sobretot a nivell embrionari. Pensem que concretar les alteracions de connectivitat del sistema ens permetrien entendre millor el fenotip que observem després a l'adult. No obstant, considerem molt important la introducció de models de control de l'expressió de *Prnp* a nivell temporal i espacial per detallar les seves funcions. El nostre grup acaba d'obtenir l'animal flox-*Prnp* ideal per aquest propòsit. Experiments de delecció de *Prnp* amb infeccions de lentivirus o adenovirus amb la recombinasa Cre en moments i espais concrets ens permetrien discernir si el fenotip observat és degut a problemes en el desenvolupament o directament a la funció de PrP^C en l'adult. Aquesta aproximació és molt interessant sobretot de cara a entendre millor el que passa en els pacients. Excepte en els casos de Prionopatia familiar on la mutació a la PrP^C s'arrossega tota la vida, en els casos esporàdics i adquirits, el canvi de conformació de la PrP^C i la reducció de la seva expressió apareixen quan el SNC ja està format. Així, eliminar-la en l'animal adult en les regions del cervell amb més afectació en els pacients, ens ajudaria a entendre la patologia.

Pel que fa a l'estudi de la malaltia, considerem que cal posar èmfasi en la recerca de biomarcadors que ens en permetin la detecció precoç. Hem avançat molt amb mostres de CSF, però encara estem lluny de poder fer una diagnosi a anys vista que ens permeti actuar clínicament. En aquest tema és crucial també trobar marcadors en mostres menys invasives com el sèrum sanguini. Recentment s'ha publicat que la cadena lleugera del neurofilament (NFL) és un biomarcador tant a nivell de CSF com de sèrum sanguini d'Alzheimer presimptomàtic (Preisich *et al.*, 2019). Sense anar més lluny, l'any passat es va descriure que el propi NFL és un marcador pel sCJD en sèrum (Thompson *et al.*, 2018).

Falten estudis longitudinals amb pacients preclínic per trobar aquests marcadors abans que la malaltia hagi avançat massa.

També ens agradaria comentar una nova forma d'entendre les malalties neurodegeneratives que cada cop té més recolzament científic. Ens referim a l'aproximació holística de la malaltia assumint que és una desregulació a nivell sistèmic, no només del SNC. I per tant, la seva causa pot provenir de fora del cervell: d'una desregulació del sistema immunitari o hormonal, d'estímuls externs com una infecció o, inclús, d'episodis d'afectació emocional o de l'ambient on vivim. La recerca genòmica i epigenòmica de l'etiologia de les malalties neurodegeneratives fins al moment no ha sigut capaç de donar resposta i la majoria de casos es consideren esporàdics quan evidentment tenen una causa. Potser senzillament no hem estat mirant en el lloc adient.

Algunes investigacions recents apunten en aquest sentit. Inamdar i col·laboradors descriuen que l'1-octen-3-ol, un compost volàtil d'origen fúngic molt present en l'aire d'ambients amb poca ventilació i humitat, causa neurodegeneració dopaminèrgica similar a la del Parkinson (Inamdar *et al.*, 2013). Altres treballs relacionen la malaltia d'Alzheimer amb una infecció fúngica. Pisa i col·laboradors detecten hifes fúngiques intra i extracel·lulars al SNC de pacients d'AD (Pisa *et al.*, 2015). Aquest mateix any, s'ha descrit una elevada presència del virus de l'herpes en diferents cohorts de pacients d'AD (Readhead *et al.*, 2018) i s'ha postulat que l'acumulació d'A β és un mecanisme de protecció propi del cervell per protegir-se contra la infecció vírica, postulant una relació directa entre la patologia i la infecció (Eimer *et al.*, 2018). Encara s'ha de desxifrar clarament la relació causa-efecte ja que les infeccions en el SNC correlacionen amb l'edat sense estar sempre relacionades amb processos patològics. No obstant, els resultats semblen encoratjadors. I si a part de la possible infectivitat també posem el nostre estat emocional a l'equació? Recentment s'ha observat que l'activació del sistema de recompensa augmenta la immunitat innata i l'adaptativa a través de la modulació del sistema simpàtic (Ben-Shaanan *et al.*, 2016) que inclús redueix la mida dels tumors en models animals (Ben-Shaanan *et al.*, 2018).

No podria ocórrer quelcom similar amb les Prionopaties? Què es desencadenin degut a una infecció? Què els pacients hagin sofert algun xoc emocional que hagués desregulat la relació del sistema de recompensa amb el sistema immunitari induint a la patologia? Són preguntes molt obertes i arriscades, però creiem que podrien obrir un nou camí per reenfocar l'estudi d'aquesta patologia tan severa, i potser, començar a entendre-la.

CONCLUSIONS

1. La mutació Y218N-*Prnp* causa un endarreriment de la diferenciació neuronal, astrogliosi i mort cel·lular als cultius neuronals derivats de les iPSC procedents d'un pacients amb GSS
2. La PrP^C-Y218N altera l'*splicing* i l'equilibri de fosforilació i desfosforilació de la proteïna Tau provocant un augment de la ràtio Tau3R / Tau4R, de la seva fosforilació i una redistribució a l'espai somatodendrític
3. La PrP^C-Y218N provoca una reducció en la velocitat del trànsit mitocondrial axonal
4. Els cultius estàndard en dues dimensions per la diferenciació neuronal d'iPSC no són un bon model per reproduir la generació espontània de PrP^{Sc} ni la seva infectivitat
5. Els *Flanking genes* presents en el ratolí B6129-*Prnp*^{0/0} exagereixen la seva susceptibilitat a l'àcid kaínic
6. La PrP^C participa en el manteniment de l'estabilitat sinàptica, la seva absència provoca un increment en la susceptibilitat a l'epilèpsia induïda amb àcid kaínic
7. L'ancoratge a membrana i el domini OR de la PrP^C són necessaris per la neuroprotecció enfront la mort per àcid kaínic en cèl·lules Neuro2a
8. L'absència de la PrP^C en el ratolí ZH3 li provoca una conducta ansiosa, una activitat reduïda i dèficits en l'aprenentatge basat en el condicionament operant
9. La PrP^C regula la sinapsi de la via col·lateral de Schaffer *in vivo*. La seva absència provoca una elevada excitabilitat i una tendència epilèptica
10. La manca de PrP^C impedeix la completa inducció de potenciació a llarg termini a la via col·lateral de Schaffer
11. La PrP^C és necessària per la correcta connectivitat i maduració de les xarxes neuronals *in vitro* en cultius primaris

BIBLIOGRAFIA

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., Edel, M., Boue, S., and Izpisua Belmonte, J.C. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26, 1276-1284.
- Adle-Biassette, H., Verney, C., Peoc'h, K., Dauge, M.C., Razavi, F., Choudat, L., Gressens, P., Budka, H., and Henin, D. (2006). Immunohistochemical expression of prion protein (PrPC) in the human forebrain during development. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 698-706.
- Aguilar-Alonso, P., Martinez-Fong, D., Pazos-Salazar, N.G., Brambila, E., Gonzalez-Barrios, J.A., Mejorada, A., Flores, G., Millan-Perezpena, L., Rubio, H., and Leon-Chavez, B.A. (2008). The increase in zinc levels and upregulation of zinc transporters are mediated by nitric oxide in the cerebral cortex after transient ischemia in the rat. *Brain Res* 1200, 89-98.
- Aguilar-Calvo, P., Garcia, C., Espinosa, J.C., Andreoletti, O., and Torres, J.M. (2015). Prion and prion-like diseases in animals. *Virus Res* 207, 82-93.
- Aguzzi, A., and Zhu, C. (2017). Microglia in prion diseases. *J Clin Invest* 127, 3230-3239.
- Almeida Silva, L.F., Engel, T., Reschke, C.R., Conroy, R.M., Langa, E., and Henshall, D.C. (2016). Distinct behavioral and epileptic phenotype differences in 129/P mice compared to C57BL/6 mice subject to intraamygdala kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Behav* 64, 186-194.
- Alonso, A.C., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996). Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2, 783-787.
- Alzualde, A., Indakoetxea, B., Ferrer, I., Moreno, F., Barandiaran, M., Gorostidi, A., Estanga, A., Ruiz, I., Calero, M., van Leeuwen, F.W., Atares, B., Juste, R., Rodriguez-Martinez, A.B., and Lopez de Munain, A. (2010). A novel PRNP Y218N mutation in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 789-800.
- Amaral, D.G., Scharfman, H.E., and Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163, 3-22.
- Ambrosi, G., Cerri, S., and Blandini, F. (2014). A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 121, 849-859.
- Amin, L., Nguyen, X.T., Rolle, I.G., D'Este, E., Giachin, G., Tran, T.H., Serbec, V.C., Cojoc, D., and Legname, G. (2016). Characterization of prion protein function by focal neurite stimulation. *J Cell Sci* 129, 3878-3891.
- Anacker, C., and Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility — linking memory and mood. *Nature Reviews Neuroscience* 18, 335.
- Anand, K.S., and Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. In: *Ann Indian Acad Neurol*, vol. 15, 239-246.
- Artinian, J., Peret, A., Marti, G., Epsztein, J., and Crepel, V. (2011). Synaptic kainate receptors in interplay with INaP shift the sparse firing of dentate granule cells to a sustained rhythmic mode in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 31, 10811-10818.
- Asante, E.A., Gowland, I., Grimshaw, A., Linehan, J.M., Smidak, M., Houghton, R., Osiguwa, O., Tomlinson, A., Joiner, S., Brandner, S., Wadsworth, J.D., and Collinge, J. (2009). Absence of spontaneous disease and comparative prion susceptibility of transgenic mice expressing mutant human prion proteins. *J Gen Virol* 90, 546-558.
- Asante, E.A., Gowland, I., Linehan, J.M., Mahal, S.P., and Collinge, J. (2002). Expression pattern of a mini human PrP gene promoter in transgenic mice. *Neurobiol Dis* 10, 1-7.

Bibliografia

Asante, E.A., Grimshaw, A., Smidak, M., Jakubcova, T., Tomlinson, A., Jeelani, A., Hamdan, S., Powell, C., Joiner, S., Linehan, J.M., Brandner, S., Wadsworth, J.D., and Collinge, J. (2015). Transmission Properties of Human PrP 102L Prions Challenge the Relevance of Mouse Models of GSS. *PLoS Pathog* 11, e1004953.

Asante, E.A., Linehan, J.M., Smidak, M., Tomlinson, A., Grimshaw, A., Jeelani, A., Jakubcova, T., Hamdan, S., Powell, C., Brandner, S., Wadsworth, J.D., and Collinge, J. (2013). Inherited prion disease A117V is not simply a proteinopathy but produces prions transmissible to transgenic mice expressing homologous prion protein. *PLoS Pathog* 9, e1003643.

Asher, D.M., and Gregori, L. (2018). Human transmissible spongiform encephalopathies: historic view. *Handb Clin Neurol* 153, 1-17.

Auladell, C., de Lemos, L., Verdaguer, E., Ettcheto, M., Busquets, O., Lazarowski, A., Beas-Zarate, C., Olloquequi, J., Folch, J., and Camins, A. (2017). Role of JNK isoforms in the kainic acid experimental model of epilepsy and neurodegeneration. *Front Biosci (Landmark Ed)* 22, 795-814.

Aulic, S., Masperone, L., Narkiewicz, J., Isopi, E., Bistaffa, E., Ambrosetti, E., Pastore, B., De Cecco, E., Scaini, D., Zago, P., Moda, F., Tagliavini, F., and Legname, G. (2017). alpha-Synuclein Amyloids Hijack Prion Protein to Gain Cell Entry, Facilitate Cell-to-Cell Spreading and Block Prion Replication. *Sci Rep* 7, 10050.

Avila, J. (2006). Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Lett* 580, 2922-2927.

Azzarelli, B., Muller, J., Ghetti, B., Dyken, M., and Conneally, P.M. (1985). Cerebellar plaques in familial Alzheimer's disease (Gerstmann-Straussler-Scheinker variant?). *Acta Neuropathol* 65, 235-246.

Bagyinszky, E., Giau, V.V., Youn, Y.C., An, S.S.A., and Kim, S. (2018). Characterization of mutations in PRNP (prion) gene and their possible roles in neurodegenerative diseases. *Neuropsychiatr Dis Treat* 14, 2067-2085.

Balducci, C., Beeg, M., Stravalaci, M., Bastone, A., Scip, A., Biasini, E., Tapella, L., Colombo, L., Manzoni, C., Borsello, T., Chiesa, R., Gobbi, M., Salmona, M., and Forloni, G. (2010). Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2295-2300.

Ballatore, C., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8, 663-672.

Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L.C., and Soderling, T.R. (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276, 2042-2045.

Bartsch, T., and Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience* 309, 1-16.

Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B., and Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417-428.

Batsche, E., and Ameyar-Zazoua, M. (2015). The influence of Argonaute proteins on alternative RNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6, 141-156.

Baumann, F., Tolnay, M., Brabeck, C., Pahnke, J., Klotz, U., Niemann, H.H., Heikenwalder, M., Rulicke, T., Burkle, A., and Aguzzi, A. (2007). Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *Embo j* 26, 538-547.

Bautista, M.J., Gutierrez, J., Salguero, F.J., Fernandez de Marco, M.M., Romero-Trevelo, J.L., and Gomez-Villamandos, J.C. (2006). BSE infection in bovine PrP transgenic mice leads to hyperphosphorylation of tau-protein. *Vet Microbiol* 115, 293-301.

Beart, and O'Shea. (2007). Transporters for L-glutamate: An update on their molecular pharmacology and pathological involvement.

Ben-Ari, Y., and Lagowska, J. (1978). [Epileptogenic action of intra-amygdaloid injection of kainic acid]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 287, 813-816.

- Ben-Shaanan, T.L., Azulay-Debby, H., Dubovik, T., Starosvetsky, E., Korin, B., Schiller, M., Green, N.L., Admon, Y., Hakim, F., Shen-Orr, S.S., and Rolls, A. (2016). Activation of the reward system boosts innate and adaptive immunity. *Nat Med* 22, 940-944.
- Ben-Shaanan, T.L., Schiller, M., Azulay-Debby, H., Korin, B., Boshnak, N., Koren, T., Krot, M., Shakya, J., Rahat, M.A., Hakim, F., and Rolls, A. (2018). Modulation of anti-tumor immunity by the brain's reward system. *Nat Commun* 9, 2723.
- Benestad, S.L., Austbo, L., Tranulis, M.A., Espenes, A., and Olsaker, I. (2012). Healthy goats naturally devoid of prion protein. *Vet Res* 43, 87.
- Benvegnu, S., Roncaglia, P., Agostini, F., Casalone, C., Corona, C., Gustincich, S., and Legname, G. (2011). Developmental influence of the cellular prion protein on the gene expression profile in mouse hippocampus. *Physiol Genomics* 43, 711-725.
- Beraldo, F.H., Arantes, C.P., Santos, T.G., Machado, C.F., Roffe, M., Hajj, G.N., Lee, K.S., Magalhaes, A.C., Caetano, F.A., Mancini, G.L., Lopes, M.H., Americo, T.A., Magdesian, M.H., Ferguson, S.S., Linden, R., Prado, M.A., and Martins, V.R. (2011). Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1 chain. *Faseb j* 25, 265-279.
- Beraldo, F.H., Ostapchenko, V.G., Xu, J.Z., Di Guglielmo, G.M., Fan, J., Nicholls, P.J., Caron, M.G., Prado, V.F., and Prado, M.A.M. (2018). Mechanisms of neuroprotection against ischemic insult by stress-inducible phosphoprotein-1/prion protein complex. *J Neurochem* 145, 68-79.
- Beringue, V., Mallinson, G., Kaisar, M., Tayebi, M., Sattar, Z., Jackson, G., Anstee, D., Collinge, J., and Hawke, S. (2003). Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain* 126, 2065-2073.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D., and Tanzi, R.E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 39, 17-23.
- Bianchi, M., Vaglio, S., Pupella, S., Marano, G., Facco, G., Liunbruno, G.M., and Grazzini, G. (2016). Leucoreduction of blood components: an effective way to increase blood safety? In: *Blood Transfus*, vol. 14, 214-227.
- Biswas, M.H.U., Almeida, S., Lopez-Gonzalez, R., Mao, W., Zhang, Z., Karydas, A., Geschwind, M.D., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Futai, K., Miller, B.L., and Gao, F.B. (2016). MMP-9 and MMP-2 Contribute to Neuronal Cell Death in iPSC Models of Frontotemporal Dementia with MAPT Mutations. *Stem Cell Reports* 7, 316-324.
- Bliss, T.V., and Gardner-Medwin, A.R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 357-374.
- Bonda, D.J., Manjila, S., Mehndiratta, P., Khan, F., Miller, B.R., Onwuzulike, K., Puoti, G., Cohen, M.L., Schonberger, L.B., and Cali, I. (2016). Human prion diseases: surgical lessons learned from iatrogenic prion transmission. *Neurosurg Focus* 41, E10.
- Borchelt, D.R., Koliatsos, V.E., Guarnieri, M., Pardo, C.A., Sisodia, S.S., and Price, D.L. (1994). Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems. *J Biol Chem* 269, 14711-14714.
- Bowie, D. (2002). External anions and cations distinguish between AMPA and kainate receptor gating mechanisms. *J Physiol* 539, 725-733.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259.
- Braak, H., and Braak, E. (1996). Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 165, 3-12.
- Brandel, J.-P., and Knight, R. (2018). Chapter 11 - Variant Creutzfeldt-Jakob disease. In: *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 153, eds. M. Pocchiari and J. Manson: Elsevier, 191-205.

Bibliografia

- Brandner, S., and Jaunmuktane, Z. (2017). Prion disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133, 197-222.
- Brazier, M.W., Davies, P., Player, E., Marken, F., Viles, J.H., and Brown, D.R. (2008). Manganese binding to the prion protein. *J Biol Chem* 283, 12831-12839.
- Bremer, J., Baumann, F., Tiberi, C., Wessig, C., Fischer, H., Schwarz, P., Steele, A.D., Toyka, K.V., Nave, K.A., Weis, J., and Aguzzi, A. (2010). Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci* 13, 310-318.
- Bribián, A., Fontana, X., Llorens, F., Gavín, R., Reina, M., García-Verdugo, J.M., Torres, J.M., de Castro, F., and del Río, J.A. (2012). Role of the cellular prion protein in oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation in the developing and adult mouse CNS. *PLoS One* 7, e33872.
- Brody, A.H., and Strittmatter, S.M. (2018). Synaptotoxic Signaling by Amyloid Beta Oligomers in Alzheimer's Disease Through Prion Protein and mGluR5. *Adv Pharmacol* 82, 293-323.
- Brown, D.R., Besinger, A., Herms, J.W., and Kretzschmar, H.A. (1998). Microglial expression of the prion protein. *Neuroreport* 9, 1425-1429.
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., and Kretzschmar, H. (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390, 684-687.
- Brunelle, B.W., O'Grady, A.M., Nicholson, E.M., and Seabury, C.M. (2016). Disparate Modes of Evolution Shaped Modern Prion (PRNP) and Prion-Related Doppel (PRND) Variation in Domestic Cattle. *PLoS One* 11, e0155924.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.
- Bullmann, T., de Silva, R., Holzer, M., Mori, H., and Arendt, T. (2007). Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus. *Hippocampus* 17, 98-102.
- Burke, R.E. (2007). Sir Charles Sherrington's the integrative action of the nervous system: a centenary appreciation. *Brain* 130, 887-894.
- Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., and Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582.
- Caine, D., Tinelli, R.J., Hyare, H., De Vita, E., Lowe, J., Lukic, A., Thompson, A., Porter, M.C., Cipolotti, L., Rudge, P., Collinge, J., and Mead, S. (2015). The cognitive profile of prion disease: a prospective clinical and imaging study. *Ann Clin Transl Neurol* 2, 548-558.
- Calderon-Garciduenas, A.L., and Duyckaerts, C. (2017). Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol* 145, 325-337.
- Calella, A.M., Farinelli, M., Nuvolone, M., Mirante, O., Moos, R., Falsig, J., Mansuy, I.M., and Aguzzi, A. (2010). Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO Mol Med* 2, 306-314.
- Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., and Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res* 134, 49-57.
- Carta, M., Fiebre, S., Gorlewicz, A., and Mulle, C. (2014). Kainate receptors in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 39, 1835-1844.
- Carulla, P., Bribián, A., Rangel, A., Gavín, R., Ferrer, I., Caelles, C., Del Río, J.A., and Llorens, F. (2011). Neuroprotective role of PrPC against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7-PSD-95 binding. *Mol Biol Cell* 22, 3041-3054.
- Chapman, A.G. (2000). Glutamate and epilepsy. *J Nutr* 130, 1043s-1045s.

- Cheng, C.J., and Daggett, V. (2014). Different misfolding mechanisms converge on common conformational changes: human prion protein pathogenic mutants Y218N and E196K. *Prion* 8, 125-135.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J.M., and et al. (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315, 331-333.
- Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E., and Oldstone, M. (2005). Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308, 1435-1439.
- Cho, M.S., Hwang, D.Y., and Kim, D.W. (2008). Efficient derivation of functional dopaminergic neurons from human embryonic stem cells on a large scale. *Nat Protoc* 3, 1888-1894.
- Cisse, M., Sanchez, P.E., Kim, D.H., Ho, K., Yu, G.Q., and Mucke, L. (2011). Ablation of cellular prion protein does not ameliorate abnormal neural network activity or cognitive dysfunction in the J20 line of human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 31, 10427-10431.
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., and Tolnay, M. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11, 909-913.
- Clinton J , Forsyth C , Royston MC , and GW, R. (1993). Synaptic degeneration is the primary neuropathological feature in prion disease: a preliminary study. *Neuroreport* 4(1):65-8.
- Coitinho, A.S., Lopes, M.H., Hajj, G.N., Rossato, J.I., Freitas, A.R., Castro, C.C., Cammarota, M., Brentani, R.R., Izquierdo, I., and Martins, V.R. (2007). Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. *Neurobiol Dis* 26, 282-290.
- Coitinho, A.S., Roesler, R., Martins, V.R., Brentani, R.R., and Izquierdo, I. (2003). Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. *Neuroreport* 14, 1375-1379.
- Colby, D.W., and Prusiner, S.B. (2011). Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a006833.
- Colling, S.B., Collinge, J., and Jefferys, J.G. (1996). Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. *Neurosci Lett* 209, 49-52.
- Colling, S.B., Khana, M., Collinge, J., and Jefferys, J.G. (1997). Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res* 755, 28-35.
- Collinge, J., Gorham, M., Hudson, F., Kennedy, A., Keogh, G., Pal, S., Rossor, M., Rudge, P., Siddique, D., Spyer, M., Thomas, D., Walker, S., Webb, T., Wroe, S., and Darbyshire, J. (2009). Safety and efficacy of quinacrine in human prion disease (PRION-1 study): a patient-preference trial. *Lancet Neurol* 8, 334-344.
- Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R., and Jefferys, J.G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370, 295-297.
- Coppola, A., and Moshe, S.L. (2012). Animal models. *Handb Clin Neurol* 107, 63-98.
- Cotto, E., Andre, M., Forgue, J., Fleury, H.J., and Babin, P.J. (2005). Molecular characterization, phylogenetic relationships, and developmental expression patterns of prion genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Febs j* 272, 500-513.
- Cox, B., Ness, F., and Tuite, M. (2003). Analysis of the generation and segregation of propagons: entities that propagate the [PSI⁺] prion in yeast. *Genetics* 165, 23-33.
- Cracco, L., Appleby, B.S., and Gambetti, P. (2018). Fatal familial insomnia and sporadic fatal insomnia. *Handb Clin Neurol* 153, 271-299.
- Creutzfeldt. (1920). Ueber eine eigenartige herdfoermige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z gesamte Neurol Psychiatr* 57, 1-18.

Bibliografia

- Criado, J.R., Sanchez-Alavez, M., Conti, B., Giacchino, J.L., Wills, D.N., Henriksen, S.J., Race, R., Manson, J.C., Chesebro, B., and Oldstone, M.B. (2005). Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis* 19, 255-265.
- Crick, F.H. (1958). On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* 12, 138-163.
- Cronier, S., Laude, H., and Peyrin, J.M. (2004). Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12271-12276.
- Cummings, K.A., and Popescu, G.K. (2015). Glycine-dependent activation of NMDA receptors. *J Gen Physiol* 145, 513-527.
- Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R.S., and Avoli, M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. In: *J Neurosci Methods*, vol. 172, 143-157.
- Curtis, J., Errington, M., Bliss, T., Voss, K., and MacLeod, N. (2003). Age-dependent loss of PTP and LTP in the hippocampus of PrP-null mice. *Neurobiol Dis* 13, 55-62.
- Daikhin, Y., and Yudkoff, M. (2000). Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr* 130, 1026s-1031s.
- Das, U., Scott, D.A., Ganguly, A., Koo, E.H., Tang, Y., and Roy, S. (2013). Activity-induced convergence of APP and BACE-1 in acidic microdomains via an endocytosis-dependent pathway. *Neuron* 79, 447-460.
- de Almeida, C.J., Chiarini, L.B., da Silva, J.P., PM, E.S., Martins, M.A., and Linden, R. (2005). The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J Leukoc Biol* 77, 238-246.
- De Cecco, E., and Legname, G. (2018). The role of the prion protein in the internalization of alpha-synuclein amyloids. *Prion* 12, 23-27.
- De Mario, A., Castellani, A., Peggion, C., Massimino, M.L., Lim, D., Hill, A.F., Sorgato, M.C., and Bertoli, A. (2015). The prion protein constitutively controls neuronal store-operated Ca(2+) entry through Fyn kinase. *Front Cell Neurosci* 9, 416.
- De Mario, A., Peggion, C., Massimino, M.L., Viviani, F., Castellani, A., Giacomello, M., Lim, D., Bertoli, A., and Sorgato, M.C. (2017). The prion protein regulates glutamate-mediated Ca(2+) entry and mitochondrial Ca(2+) accumulation in neurons. *J Cell Sci* 130, 2736-2746.
- Dean, B., Tsatsanis, A., Lam, L.Q., Scarr, E., and Duce, J.A. (2018). Changes in cortical protein markers of iron transport with gender, major depressive disorder and suicide. *World J Biol Psychiatry*, 1-23.
- Del Rio, J.A., Ferrer, I., and Gavin, R. (2018). Role of cellular prion protein in interneuronal amyloid transmission. *Prog Neurobiol* 165-167, 87-102.
- del Rio, J.A., and Gavin, R. (2016). Functions of the cellular prion protein, the end of Moore's law, and Ockham's razor theory. *Prion* 10, 25-40.
- Delgado-Garcia, J.M., and Gruart, A. (2017). Learning as a Functional State of the Brain: Studies in Wild-Type and Transgenic Animals. *Adv Exp Med Biol* 1015, 75-93.
- Deng, W., Aimone, J.B., and Gage, F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11, 339-350.
- Dhir, A. (2012). Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Curr Protoc Neurosci Chapter 9*, Unit9.37.
- Diaz-Espinoza, R., Morales, R., Concha-Marambio, L., Moreno-Gonzalez, I., Moda, F., and Soto, C. (2018). Treatment with a non-toxic, self-replicating anti-prion delays or prevents prion disease in vivo. *Mol Psychiatry* 23, 777-788.
- Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., DeVoe, A.G., Streeten, B., and Cowen, D. (1974). Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 290, 692-693.

- Eimer, W.A., Vijaya Kumar, D.K., Navalpur Shanmugam, N.K., Rodriguez, A.S., Mitchell, T., Washicosky, K.J., Gyorgy, B., Breakefield, X.O., Tanzi, R.E., and Moir, R.D. (2018). Alzheimer's Disease-Associated beta-Amyloid Is Rapidly Seeded by Herpesviridae to Protect against Brain Infection. *Neuron* 99, 56-63.e53.
- Emerman, A.B., Zhang, Z.R., Chakrabarti, O., and Hegde, R.S. (2010). Compartment-restricted biotinylation reveals novel features of prion protein metabolism in vivo. *Mol Biol Cell* 21, 4325-4337.
- Espuny-Camacho, I., Michelsen, K.A., Gall, D., Linaro, D., Hasche, A., Bonnefont, J., Bali, C., Orduz, D., Bilheu, A., Herpoel, A., Lambert, N., Gaspard, N., Peron, S., Schiffmann, S.N., Giugliano, M., Gaillard, A., and Vanderhaeghen, P. (2013). Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits in vivo. *Neuron* 77, 440-456.
- Falsig, J., and Aguzzi, A. (2008). The prion organotypic slice culture assay--POSCA. *Nat Protoc* 3, 555-562.
- Fan, J., Stemkowski, P.L., Gandini, M.A., Black, S.A., Zhang, Z., Souza, I.A., Chen, L., and Zamponi, G.W. (2016). Reduced Hyperpolarization-Activated Current Contributes to Enhanced Intrinsic Excitability in Cultured Hippocampal Neurons from PrP^{-/-} Mice. *Front Cell Neurosci* 10.
- Faris, R., Moore, R.A., Ward, A., Race, B., Dorward, D.W., Hollister, J.R., Fischer, E.R., and Priola, S.A. (2017a). Cellular prion protein is present in mitochondria of healthy mice. *Sci Rep* 7, 41556.
- Faris, R., Moore, R.A., Ward, A., Sturdevant, D.E., and Priola, S.A. (2017b). Mitochondrial Respiration Is Impaired during Late-Stage Hamster Prion Infection. *J Virol* 91.
- Fernandez-Nogales, M., Cabrera, J.R., Santos-Galindo, M., Hoozemans, J.J., Ferrer, I., Rozemuller, A.J., Hernandez, F., Avila, J., and Lucas, J.J. (2014). Huntington's disease is a four-repeat tauopathy with tau nuclear rods. *Nat Med* 20, 881-885.
- Ferraguti, F., Crepaldi, L., and Nicoletti, F. (2008). Metabotropic glutamate 1 receptor: current concepts and perspectives. *Pharmacol Rev* 60, 536-581.
- Ferraro, T.N., Golden, G.T., Smith, G.G., DeMuth, D., Buono, R.J., and Berrettini, W.H. (2002). Mouse strain variation in maximal electroshock seizure threshold. *Brain Res* 936, 82-86.
- Ferreira, D.G., Temido-Ferreira, M., Vicente Miranda, H., Batalha, V.L., Coelho, J.E., Szego, E.M., Marques-Morgado, I., Vaz, S.H., Rhee, J.S., Schmitz, M., Zerr, I., Lopes, L.V., and Outeiro, T.F. (2017). alpha-synuclein interacts with PrP(C) to induce cognitive impairment through mGluR5 and NMDAR2B. *Nat Neurosci* 20, 1569-1579.
- Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M., Puig, B., Ribera, R., Rey, M.J., and Ribalta, T. (2001). Prion protein expression in senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 101, 49-56.
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo j* 15, 1255-1264.
- Flechsig, E., Shmerling, D., Hegyi, I., Raeber, A.J., Fischer, M., Cozzio, A., von Mering, C., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (2000). Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron* 27, 399-408.
- Fleisch, V.C., Leighton, P.L., Wang, H., Pillay, L.M., Ritzel, R.G., Bhinder, G., Roy, B., Tierney, K.B., Ali, D.W., Waskiewicz, A.J., and Allison, W.T. (2013). Targeted mutation of the gene encoding prion protein in zebrafish reveals a conserved role in neuron excitability. *Neurobiol Dis* 55, 11-25.
- Fluharty, B.R., Biasini, E., Stravalaci, M., Sclip, A., Diomedea, L., Balducci, C., La Vitola, P., Messa, M., Colombo, L., Forloni, G., Borsello, T., Gobbi, M., and Harris, D.A. (2013). An N-terminal fragment of the prion protein binds to amyloid-beta oligomers and inhibits their neurotoxicity in vivo. *J Biol Chem* 288, 7857-7866.
- Fong, J.C., Rojas, J.C., Bang, J., Legati, A., Rankin, K.P., Forner, S., Miller, Z.A., Karydas, A.M., Coppola, G., Grouse, C.K., Ralph, J., Miller, B.L., and Geschwind, M.D. (2017). Genetic Prion Disease Caused by PRNP Q160X Mutation Presenting with an Orbitofrontal Syndrome, Cyclic Diarrhea, and Peripheral Neuropathy. *J Alzheimers Dis* 55, 249-258.

Bibliografia

Foresti, M.L., Arisi, G.M., and Shapiro, L.A. (2011). Role of glia in epilepsy-associated neuropathology, neuroinflammation and neurogenesis. *Brain Res Rev* 66, 115-122.

Freir, D.B., Nicoll, A.J., Klyubin, I., Panico, S., McDonald, J.M., Risse, E., Asante, E.A., Farrow, M.A., Sessions, R.B., Saibil, H.R., Clarke, A.R., Rowan, M.J., Walsh, D.M., and Collinge, J. (2011). Interaction between prion protein and toxic amyloid β assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. In: *Nat Commun*, vol. 2, 336-.

Frost, B., Jacks, R.L., and Diamond, M.I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 284, 12845-12852.

Fuhrmann, M., Bittner, T., Mitteregger, G., Haider, N., Moosmang, S., Kretschmar, H., and Herms, J. (2006). Loss of the cellular prion protein affects the Ca^{2+} homeostasis in hippocampal CA1 neurons. *J Neurochem* 98, 1876-1885.

Fuster-Matanzo, A., Hernandez, F., and Avila, J. (2018). Tau Spreading Mechanisms; Implications for Dysfunctional Tauopathies. *Int J Mol Sci* 19.

Gadotti, V.M., Bonfield, S.P., and Zamponi, G.W. (2012). Depressive-like behaviour of mice lacking cellular prion protein. *Behav Brain Res* 227, 319-323.

Gaiteri, C., Mostafavi, S., Honey, C.J., De Jager, P.L., and Bennett, D.A. (2016). Genetic variants in Alzheimer disease - molecular and brain network approaches. *Nat Rev Neurol* 12, 413-427.

Gajdusek, D.C., and Zigas, V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* 257, 974-978.

Gambetti, P., Dong, Z., Yuan, J., Xiao, X., Zheng, M., Alshekhlee, A., Castellani, R., Cohen, M., Barria, M.A., Gonzalez-Romero, D., Belay, E.D., Schonberger, L.B., Marder, K., Harris, C., Burke, J.R., Montine, T., Wisniewski, T., Dickson, D.W., Soto, C., Hulette, C.M., Mastrianni, J.A., Kong, Q., and Zou, W.Q. (2008). A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol* 63, 697-708.

Gasparini, L., Meneghetti, E., Pastore, B., Benetti, F., and Legname, G. (2015). Prion protein and copper cooperatively protect neurons by modulating NMDA receptor through S-nitrosylation. *Antioxid Redox Signal* 22, 772-784.

Gerstmann, J. (1928). Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphanomen bei einer Erkrankung des zerebellaren Systems. *Wien Med Wochenschr* 78, 906-908.

Gerstmann J, Straüssler E, and J., S. (1936). Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zeitschrift für Neurologie* 154, 736-762.

Geschwind, M.D., Kuo, A.L., Wong, K.S., Haman, A., Devereux, G., Raudabaugh, B.J., Johnson, D.Y., Torres-Chae, C.C., Finley, R., Garcia, P., Thai, J.N., Cheng, H.Q., Neuhaus, J.M., Forner, S.A., Duncan, J.L., Possin, K.L., Dearmond, S.J., Prusiner, S.B., and Miller, B.L. (2013). Quinacrine treatment trial for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 81, 2015-2023.

Ghetti, B., Tagliavini, F., Giaccone, G., Bugiani, O., Frangione, B., Farlow, M.R., and Dlouhy, S.R. (1994). Familial Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Mol Neurobiol* 8, 41-48.

Giaccone, G., Mangieri, M., Capobianco, R., Limido, L., Hauw, J.J., Haik, S., Fociani, P., Bugiani, O., and Tagliavini, F. (2008). Tauopathy in human and experimental variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging* 29, 1864-1873.

Gibbings, D., Leblanc, P., Jay, F., Pontier, D., Michel, F., Schwab, Y., Alais, S., Lagrange, T., and Voinnet, O. (2012). Human prion protein binds Argonaute and promotes accumulation of microRNA effector complexes. *Nat Struct Mol Biol* 19, 517-524, s511.

Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Coffey, E.E., Gunther, E.C., Lauren, J., Gimbel, Z.A., and Strittmatter, S.M. (2010). Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci* 30, 6367-6374.

- Goedert, M., and Jakes, R. (2005). Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739, 240-250.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519-526.
- Goldgaber, D., Goldfarb, L.G., Brown, P., Asher, D.M., Brown, W.T., Lin, S., Teener, J.W., Feinstein, S.M., Rubenstein, R., Kascsak, R.J., and et al. (1989). Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker's syndrome. *Exp Neurol* 106, 204-206.
- Goniotaki, D., Lakkaraju, A.K.K., Shrivastava, A.N., Bakirci, P., Sorce, S., Senatore, A., Marpakwar, R., Hornemann, S., Gasparini, F., Triller, A., and Aguzzi, A. (2017). Inhibition of group-I metabotropic glutamate receptors protects against prion toxicity. *PLoS Pathog* 13, e1006733.
- Goodall, C.A., Head, M.W., Everington, D., Ironside, J.W., Knight, R.S., and Green, A.J. (2006). Raised CSF phospho-tau concentrations in variant Creutzfeldt-Jakob disease: diagnostic and pathological implications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 89-91.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., and Ruddle, F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7380-7384.
- Granger, A.J., Shi, Y., Lu, W., Cerpas, M., and Nicoll, R.A. (2013). LTP requires a reserve pool of glutamate receptors independent of subunit type. *Nature* 493, 495-500.
- Griffiths, H.H., Whitehouse, I.J., and Hooper, N.M. (2012). Regulation of amyloid-beta production by the prion protein. *Prion* 6, 217-222.
- Gulinello, M., Mitchell, H.A., Chang, Q., Timothy O'Brien, W., Zhou, Z., Abel, T., Wang, L., Corbin, J.G., Veeraragavan, S., Samaco, R.C., Andrews, N.A., Fagioli, M., Cole, T.B., Burbacher, T.M., and Crawley, J.N. (2018). Rigor and reproducibility in rodent behavioral research. *Neurobiol Learn Mem*.
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006270.
- Hadlow, W.J. (1959). SCRAPIE AND KURU. *The Lancet* 274, 289-290.
- Han, J., Zhang, J., Yao, H., Wang, X., Li, F., Chen, L., Gao, C., Gao, J., Nie, K., Zhou, W., and Dong, X. (2006). Study on interaction between microtubule associated protein tau and prion protein. *Sci China C Life Sci* 49, 473-479.
- Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.
- Harrison, P.M., Khachane, A., and Kumar, M. (2010). Genomic assessment of the evolution of the prion protein gene family in vertebrates. *Genomics* 95, 268-277.
- Hartmann, A., Muth, C., Dabrowski, O., Krasemann, S., and Glatzel, M. (2017). Exosomes and the Prion Protein: More than One Truth. *Front Neurosci* 11, 194.
- Hasan, M.T., Hernandez-Gonzalez, S., Dogbevia, G., Trevino, M., Bertocchi, I., Gruart, A., and Delgado-Garcia, J.M. (2013). Role of motor cortex NMDA receptors in learning-dependent synaptic plasticity of behaving mice. *Nat Commun* 4, 2258.
- Hayashi, T. (1952). A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn J Physiol* 3, 46-64.
- Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., and Malinow, R. (2000). Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287, 2262-2267.

Bibliografia

Henley, J.M., and Wilkinson, K.A. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 17, 337-350.

Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schurmann, P., Windl, O., Brose, N., and Kretzschmar, H. (1999). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* 19, 8866-8875.

Herms, J.W., Korte, S., Gall, S., Schneider, I., Dunker, S., and Kretzschmar, H.A. (2000). Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *J Neurochem* 75, 1487-1492.

Herring, B.E., and Nicoll, R.A. (2016). Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. *Annu Rev Physiol* 78, 351-365.

Herrmann, U.S., Sonati, T., Falsig, J., Reimann, R.R., Dametto, P., O'Connor, T., Li, B., Lau, A., Hornemann, S., Sorce, S., Wagner, U., Sanoudou, D., and Aguzzi, A. (2015). Prion infections and anti-PrP antibodies trigger converging neurotoxic pathways. *PLoS Pathog* 11, e1004662.

Hetz, C., Maundrell, K., and Soto, C. (2003). Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends Mol Med* 9, 237-243.

Hirsch, T.Z., Martin-Lannere, S., and Mouillet-Richard, S. (2017). Functions of the Prion Protein. *Prog Mol Biol Transl Sci* 150, 1-34.

Hirsch, T.Z., Martin-Lannere, S., Reine, F., Hernandez-Rapp, J., Herzog, L., Dron, M., Privat, N., Passet, B., Halliez, S., Villa-Diaz, A., Lacroux, C., Klein, V., Haik, S., Andreoletti, O., Torres, J.M., Vilotte, J.L., Beringue, V., and Mouillet-Richard, S. (2018). Epigenetic Control of the Notch and Eph Signaling Pathways by the Prion Protein: Implications for Prion Diseases. *Mol Neurobiol*.

Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B.I., Geschwind, D.H., Bird, T.D., McKeel, D., Goate, A., Morris, J.C., Wilhelmsen, K.C., Schellenberg, G.D., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1998). Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 282, 1914-1917.

Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., Yuan, L.L., Ashe, K.H., and Liao, D. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067-1081.

Hsiao, K., Baker, H.F., Crow, T.J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J.D., Westaway, D., Ott, J., and Prusiner, S.B. (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* 338, 342-345.

Hsiao, K., Dlouhy, S.R., Farlow, M.R., Cass, C., Da Costa, M., Conneally, P.M., Hodes, M.E., Ghetti, B., and Prusiner, S.B. (1992). Mutant prion proteins in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nat Genet* 1, 68-71.

Hu, N.W., Nicoll, A.J., Zhang, D., Mably, A.J., O'Malley, T., Purro, S.A., Terry, C., Collinge, J., Walsh, D.M., and Rowan, M.J. (2014). mGlu5 receptors and cellular prion protein mediate amyloid-beta-facilitated synaptic long-term depression in vivo. *Nat Commun* 5, 3374.

Hébert, S.S., Sergeant, N., and Buée, L. (2012). MicroRNAs and the Regulation of Tau Metabolism. *Int J Alzheimers Dis* 2012.

Iacobucci, G.J., and Popescu, G.K. (2017). NMDA receptors: linking physiological output to biophysical operation. *Nat Rev Neurosci* 18, 236-249.

Inamdar, A.A., Hossain, M.M., Bernstein, A.I., Miller, G.W., Richardson, J.R., and Bennett, J.W. (2013). Fungal-derived semiochemical 1-octen-3-ol disrupts dopamine packaging and causes neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Iovino, M., Agathou, S., Gonzalez-Rueda, A., Del Castillo Velasco-Herrera, M., Borroni, B., Alberici, A., Lynch, T., O'Dowd, S., Geti, I., Gaffney, D., Vallier, L., Paulsen, O., Karadottir, R.T., and Spillantini, M.G. (2015). Early

maturation and distinct tau pathology in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with MAPT mutations. *Brain* 138, 3345-3359.

Ironside, J.W., Ritchie, D.L., and Head, M.W. (2017). Prion diseases. *Handb Clin Neurol* 145, 393-403.

Ishimoto, T., Omori, N., Mutoh, F., and Chiba, S. (2000). Convulsive seizures induced by N-methyl-D-aspartate microinjection into the mesencephalic reticular formation in rats. *Brain Res* 881, 152-158.

Ishizawa, K., Komori, T., Shimazu, T., Yamamoto, T., Kitamoto, T., Shimazu, K., and Hirose, T. (2002). Hyperphosphorylated tau deposition parallels prion protein burden in a case of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome P102L mutation complicated with dementia. *Acta Neuropathol* 104, 342-350.

Ishizawa, K., Mitsufuji, T., Shioda, K., Kobayashi, A., Komori, T., Nakazato, Y., Kitamoto, T., Araki, N., Yamamoto, T., and Sasaki, A. (2018). An autopsy report of three kindred in a Gerstmann-Straussler-Scheinker disease P105L family with a special reference to prion protein, tau, and beta-amyloid. *Brain Behav*, e1117.

Israel, M.A., Yuan, S.H., Bardy, C., Reyna, S.M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M.P., Van Gorp, S., Nazor, K.L., Boscolo, F.S., Carson, C.T., Laurent, L.C., Marsala, M., Gage, F.H., Remes, A.M., Koo, E.H., and Goldstein, L.S. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 482, 216-220.

Jackman, S.L., and Regehr, W.G. (2017). The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation. *Neuron* 94, 447-464.

Jackson, C., Welch, H.C., and Bellamy, T.C. (2010). Control of cerebellar long-term potentiation by P-Rex-family guanine-nucleotide exchange factors and phosphoinositide 3-kinase. *PLoS One* 5, e11962.

Jakob. (1921). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bewerkenswertem anatomische Befunde (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* 70, 132-146.

Jansen, C., Parchi, P., Jelles, B., Gouw, A.A., Beunders, G., van Spaendonk, R.M., van de Kamp, J.M., Lemstra, A.W., Capellari, S., and Rozemuller, A.J. (2011). The first case of fatal familial insomnia (FFI) in the Netherlands: a patient from Egyptian descent with concurrent four repeat tau deposits. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37, 549-553.

Jaunmuktane, Z., Mead, S., Ellis, M., Wadsworth, J.D., Nicoll, A.J., Kenny, J., Launchbury, F., Linehan, J., Richard-Loendt, A., Walker, A.S., Rudge, P., Collinge, J., and Brandner, S. (2015). Evidence for human transmission of amyloid-beta pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature* 525, 247-250.

Jeon, I., Lee, N., Li, J.Y., Park, I.H., Park, K.S., Moon, J., Shim, S.H., Choi, C., Chang, D.J., Kwon, J., Oh, S.H., Shin, D.A., Kim, H.S., Do, J.T., Lee, D.R., Kim, M., Kang, K.S., Daley, G.Q., Brundin, P., and Song, J. (2012). Neuronal properties, in vivo effects, and pathology of a Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 30, 2054-2062.

Jessberger, S., and Parent, J.M. (2015). Epilepsy and Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.

Jia, M., Njapo, S.A., Rastogi, V., and Hedna, V.S. (2015). Taming glutamate excitotoxicity: strategic pathway modulation for neuroprotection. *CNS Drugs* 29, 153-162.

Jones, N. (2011). Stroke: Disruption of the nNOS-PSD-95 complex is neuroprotective in models of cerebral ischemia. *Nat Rev Neurol* 7, 61.

Kanata, E., Golanska, E., Villar-Pique, A., Karsanidou, A., Dafou, D., Xanthopoulos, K., Schmitz, M., Ferrer, I., Karch, A., Sikorska, B., Liberski, P.P., Sklaviadis, T., Zerr, I., and Llorens, F. (2018). Cerebrospinal fluid neurofilament light in suspected sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Clin Neurosci*.

Kandel, E., Schwartz, J., Siegelbaum, S., and Hudspeth, A. (2012). *Principles of Neural Science 5th Edition*. McGraw Hill Professional: New York.

Kanner, A.M. (2011). Anxiety disorders in epilepsy: the forgotten psychiatric comorbidity. *Epilepsy Curr* 11, 90-91.

Bibliografia

- Kerchner, G.A., Wang, G.D., Qiu, C.S., Huettner, J.E., and Zhuo, M. (2001). Direct presynaptic regulation of GABA/glycine release by kainate receptors in the dorsal horn: an ionotropic mechanism. *Neuron* 32, 477-488.
- Khosravani, H., Zhang, Y., Tsutsui, S., Hameed, S., Altier, C., Hamid, J., Chen, L., Villemaire, M., Ali, Z., Jirik, F.R., and Zamponi, G.W. (2008). Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Cell Biol* 181, 551-565.
- Kitamoto, T., Iizuka, R., and Tateishi, J. (1993). An amber mutation of prion protein in Gerstmann-Straussler syndrome with mutant PrP plaques. *Biochem Biophys Res Commun* 192, 525-531.
- Klatzo, I., Gajdusek, D.C., and Zigas, V. (1959). Pathology of Kuru. *Lab Invest* 8, 799-847.
- Klohn, P.C., Stoltze, L., Flechsig, E., Enari, M., and Weissmann, C. (2003). A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11666-11671.
- Kostylev, M.A., Kaufman, A.C., Nygaard, H.B., Patel, P., Haas, L.T., Gunther, E.C., Vortmeyer, A., and Strittmatter, S.M. (2015). Prion-Protein-interacting Amyloid-beta Oligomers of High Molecular Weight Are Tightly Correlated with Memory Impairment in Multiple Alzheimer Mouse Models. *J Biol Chem* 290, 17415-17438.
- Kovacs, G.G., Rahimi, J., Strobel, T., Lutz, M.I., Regelsberger, G., Streichenberger, N., Perret-Liaudet, A., Hoftberger, R., Liberski, P.P., Budka, H., and Sikorska, B. (2017). Tau pathology in Creutzfeldt-Jakob disease revisited. *Brain Pathol* 27, 332-344.
- Kovacs, G.G., Seguin, J., Quadrio, I., Hoftberger, R., Kapas, I., Streichenberger, N., Biacabe, A.G., Meyronet, D., Sciot, R., Vandenbergh, R., Majtenyi, K., Laszlo, L., Strobel, T., Budka, H., and Perret-Liaudet, A. (2011). Genetic Creutzfeldt-Jakob disease associated with the E200K mutation: characterization of a complex proteinopathy. *Acta Neuropathol* 121, 39-57.
- Krasnianski, A., Sanchez Juan, P., Ponto, C., Bartl, M., Heinemann, U., Vargas, D., Schulz-Schaeffer, W.J., Kretzschmar, H.A., and Zerr, I. (2014). A proposal of new diagnostic pathway for fatal familial insomnia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85, 654-659.
- Krejciova, Z., Alibhai, J., Zhao, C., Krencik, R., Rzechorzek, N.M., Ullian, E.M., Manson, J., Ironside, J.W., Head, M.W., and Chandran, S. (2017). Human stem cell-derived astrocytes replicate human prions in a PRNP genotype-dependent manner. *J Exp Med* 214, 3481-3495.
- Kretzschmar, H.A., Neumann, M., and Stavrou, D. (1995). Codon 178 mutation of the human prion protein gene in a German family (Backer family): sequencing data from 72-year-old celloidin-embedded brain tissue. *Acta Neuropathol* 89, 96-98.
- Kretzschmar, H.A., Prusiner, S.B., Stowring, L.E., and DeArmond, S.J. (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* 122, 1-5.
- Kristensen, A.S., Jenkins, M.A., Banke, T.G., Schousboe, A., Makino, Y., Johnson, R.C., Huganir, R., and Traynelis, S.F. (2011). Mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulation of AMPA receptor gating. *Nat Neurosci* 14, 727-735.
- Kudo, W., Lee, H.P., Zou, W.Q., Wang, X., Perry, G., Zhu, X., Smith, M.A., Petersen, R.B., and Lee, H.G. (2012). Cellular prion protein is essential for oligomeric amyloid-beta-induced neuronal cell death. *Hum Mol Genet* 21, 1138-1144.
- Kuffer, A., Lakkaraju, A.K., Mogha, A., Petersen, S.C., Airich, K., Doucerain, C., Marpakwar, R., Bakirci, P., Senatore, A., Monnard, A., Schiavi, C., Nuvolone, M., Grosshans, B., Hornemann, S., Bassilana, F., Monk, K.R., and Aguzzi, A. (2016). The prion protein is an agonistic ligand of the G protein-coupled receptor Adgrg6. *Nature* 536, 464-468.
- Kumar, N., Boeve, B.F., Boot, B.P., Orr, C.F., Duffy, J., Woodruff, B.K., Nair, A.K., Ellison, J., Kuntz, K., Kantarci, K., Jack, C.R., Jr., Westmoreland, B.F., Fields, J.A., Baker, M., Rademakers, R., Parisi, J.E., and Dickson, D.W. (2011). Clinical characterization of a kindred with a novel 12-octapeptide repeat insertion in the prion protein gene. *Arch Neurol* 68, 1165-1170.
- Ladogana, A., and Kovacs, G.G. (2018). Genetic Creutzfeldt-Jakob disease. *Handb Clin Neurol* 153, 219-242.

- Ladogana, A., Liu, Q., Xi, Y.G., and Pocchiari, M. (1995). Proteinase-resistant protein in human neuroblastoma cells infected with brain material from Creutzfeldt-Jakob patient. In: *Lancet*, vol. 345, England, 594-595.
- Lai, T.W., Zhang, S., and Wang, Y.T. (2014). Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 115, 157-188.
- Laplanche, J.L., Hachimi, K.H., Durieux, I., Thuillet, P., Defebvre, L., Delasnerie-Laupretre, N., Peoc'h, K., Foncin, J.F., and Destee, A. (1999). Prominent psychiatric features and early onset in an inherited prion disease with a new insertional mutation in the prion protein gene. *Brain* 122 (Pt 12), 2375-2386.
- Larson, M., Sherman, M.A., Amar, F., Nuvolone, M., Schneider, J.A., Bennett, D.A., Aguzzi, A., and Lesne, S.E. (2012). The complex PrP(c)-Fyn couples human oligomeric Abeta with pathological tau changes in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32, 16857-16871a.
- Lauren, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W., and Strittmatter, S.M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457, 1128-1132.
- Lawson, V.A., Klemm, H.M., Welton, J.M., Masters, C.L., Crouch, P., Cappai, R., and Ciccotosto, G.D. (2011). Gene knockout of tau expression does not contribute to the pathogenesis of prion disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 70, 1036-1045.
- Lee, H.K., Takamiya, K., Han, J.S., Man, H., Kim, C.H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R.S., Wenthold, R.J., Gallagher, M., and Huganir, R.L. (2003). Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 112, 631-643.
- Lee, V.M., Goedert, M., and Trojanowski, J.Q. (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24, 1121-1159.
- Lehrman, E.K., Wilton, D.K., Litvina, E.Y., Welsh, C.A., Chang, S.T., Frouin, A., Walker, A.J., Heller, M.D., Umemori, H., Chen, C., and Stevens, B. (2018). CD47 Protects Synapses from Excess Microglia-Mediated Pruning during Development. *Neuron* 100, 120-134.e126.
- Lei, P., Ayton, S., Finkelstein, D.I., Adlard, P.A., Masters, C.L., and Bush, A.I. (2010). Tau protein: relevance to Parkinson's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1775-1778.
- Leighton, P.L., and Allison, W.T. (2016). Protein Misfolding in Prion and Prion-Like Diseases: Reconsidering a Required Role for Protein Loss-of-Function. *J Alzheimers Dis* 54, 3-29.
- Leighton, P.L.A., Nadolski, N.J., Morrill, A., Hamilton, T.J., and Allison, W.T. (2018). An ancient conserved role for prion protein in learning and memory. *Biol Open* 7.
- Lerma, J., and Marques, J.M. (2013). Kainate receptors in health and disease. *Neuron* 80, 292-311.
- Levesque, M., and Avoli, M. (2013). The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 37, 2887-2899.
- Li, A., Christensen, H.M., Stewart, L.R., Roth, K.A., Chiesa, R., and Harris, D.A. (2007). Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *Embo j* 26, 548-558.
- Li, C., and Gotz, J. (2017). Somatodendritic accumulation of Tau in Alzheimer's disease is promoted by Fyn-mediated local protein translation. *Embo j* 36, 3120-3138.
- Li, Q., Lu, Q., Lu, H., and Tian, S. (2013). Systemic autoimmunity in TAM triple knockout mice causes inflammatory brain damage and cell death. *PLoS One* 8, e64812.
- Liberski, P.P., and Ironside, J.W. (2004). An outline of the neuropathology of transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases). *Folia Neuropathol* 42 Suppl B, 39-58.
- Lin, Y.T., Seo, J., Gao, F., Feldman, H.M., Wen, H.L., Penney, J., Cam, H.P., Gjoneska, E., Raja, W.K., Cheng, J., Rueda, R., Kritskiy, O., Abdurrob, F., Peng, Z., Milo, B., Yu, C.J., Elmsaouri, S., Dey, D., Ko, T., Yankner, B.A., and Tsai, L.H. (2018). APOE4 Causes Widespread Molecular and Cellular Alterations Associated with Alzheimer's Disease Phenotypes in Human iPSC-Derived Brain Cell Types. *Neuron* 98, 1141-1154.e1147.

Bibliografia

- Linden, R., Martins, V.R., Prado, M.A., Cammarota, M., Izquierdo, I., and Brentani, R.R. (2008). Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88, 673-728.
- Lipp, H.P., Stagiar-Bozicevic, M., Fischer, M., and Wolfer, D.P. (1998). A 2-year longitudinal study of swimming navigation in mice devoid of the prion protein: no evidence for neurological anomalies or spatial learning impairments. *Behav Brain Res* 95, 47-54.
- Lisman, J., Yasuda, R., and Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 13, 169-182.
- Lledo, P.M., Tremblay, P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Nicoll, R.A. (1996). Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2403-2407.
- Llorens, F., Ansoleaga, B., Garcia-Esparcia, P., Zafar, S., Grau-Rivera, O., Lopez-Gonzalez, I., Blanco, R., Carmona, M., Yague, J., Nos, C., Del Rio, J.A., Gelpi, E., Zerr, I., and Ferrer, I. (2013a). PrP mRNA and protein expression in brain and PrP(c) in CSF in Creutzfeldt-Jakob disease MM1 and VV2. *Prion* 7, 383-393.
- Llorens, F., Carulla, P., Villa, A., Torres, J.M., Fortes, P., Ferrer, I., and del Río, J.A. (2013b). PrP(C) regulates epidermal growth factor receptor function and cell shape dynamics in Neuro2a cells. *J Neurochem* 127, 124-138.
- Lothman, E.W., Bertram, E.H., 3rd, and Stringer, J.L. (1991). Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog Neurobiol* 37, 1-82.
- Loubet, D., Dakowski, C., Pietri, M., Pradines, E., Bernard, S., Callebert, J., Ardila-Osorio, H., Mouillet-Richard, S., Launay, J.M., Kellermann, O., and Schneider, B. (2011). Neuritogenesis: the prion protein controls beta1 integrin signaling activity. *FASEB J*.
- Lu, W., Shi, Y., Jackson, A.C., Bjorgan, K., During, M.J., Sprengel, R., Seeburg, P.H., and Nicoll, R.A. (2009). Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* 62, 254-268.
- Lu, Y.Y., Li, Z.Z., Jiang, D.S., Wang, L., Zhang, Y., Chen, K., Zhang, X.F., Liu, Y., Fan, G.C., Chen, Y., Yang, Q., Zhou, Y., Zhang, X.D., Liu, D.P., and Li, H. (2013). TRAF1 is a critical regulator of cerebral ischaemia-reperfusion injury and neuronal death. *Nat Commun* 4, 2852.
- Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Lugaresi, A., Tinuper, P., Zucconi, M., and Gambetti, P. (1986). Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 315, 997-1003.
- Madroñal, N., Gruart, A., and Delgado-García, J.M. (2009). Differing presynaptic contributions to LTP and associative learning in behaving mice. *Front Behav Neurosci* 3, 7.
- Makzhami, S., Passet, B., Halliez, S., Castille, J., Moazami-Goudarzi, K., Duchesne, A., Vilotte, M., Laude, H., Mouillet-Richard, S., Beringue, V., Vaiman, D., and Vilotte, J.L. (2014). The prion protein family: a view from the placenta. *Front Cell Dev Biol* 2, 35.
- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Kohn, P.C., Brandner, S., and Collinge, J. (2003). Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302, 871-874.
- Mallucci, G.R., Ratte, S., Asante, E.A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J.G., and Collinge, J. (2002). Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *Embo j* 21, 202-210.
- Manson, J., West, J.D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M.H., and Hope, J. (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 115, 117-122.
- Manson, J.C., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Aitchison, L., McConnell, I., and Hope, J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8, 121-127.

- Manson, J.C., Hope, J., Clarke, A.R., Johnston, A., Black, C., and MacLeod, N. (1995). PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration* 4, 113-114.
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C.M., Magnaudeix, A., Perrin, M.L., Yardin, C., and Terro, F. (2013). Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 12, 289-309.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D., and Morris, R.G. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23, 649-711.
- Massimino, M.L., Peggion, C., Loro, F., Stella, R., Megighian, A., Scorzeto, M., Blaauw, B., Toniolo, L., Sorgato, M.C., Reggiani, C., and Bertoli, A. (2016). Age-dependent neuromuscular impairment in prion protein knockout mice. *Muscle Nerve* 53, 269-279.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C., and Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761-766.
- Mazzitelli, M., Palazzo, E., Maione, S., and Neugebauer, V. (2018). Group II Metabotropic Glutamate Receptors: Role in Pain Mechanisms and Pain Modulation. *Front Mol Neurosci* 11, 383.
- McCord, M.C., Lorenzana, A., Bloom, C.S., Chancer, Z.O., and Schauwecker, P.E. (2008). Effect of age on kainate-induced seizure severity and cell death. *Neuroscience* 154, 1143-1153.
- McCulloch, L., Brown, K.L., and Mabbott, N.A. (2013). Ablation of the cellular prion protein, PrPC, specifically on follicular dendritic cells has no effect on their maturation or function. *Immunology* 138, 246-257.
- McKhann, G.M., 2nd, Wenzel, H.J., Robbins, C.A., Sosunov, A.A., and Schwartzkroin, P.A. (2003). Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality, and hippocampal pathology. *Neuroscience* 122, 551-561.
- Meador, K.J. (2007). The basic science of memory as it applies to epilepsy. *Epilepsia* 48 Suppl 9, 23-25.
- Medel-Matus, J.S., Shin, D., Sankar, R., and Mazarati, A. (2017). Kindling epileptogenesis and panic-like behavior: Their bidirectional connection and contribution to epilepsy-associated depression. *Epilepsy Behav* 77, 33-38.
- Meldrum, B.S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130, 1007s-1015s.
- Mercer, R.C., Ma, L., Watts, J.C., Strome, R., Wohlgemuth, S., Yang, J., Cashman, N.R., Coulthart, M.B., Schmitt-Ulms, G., Jhamandas, J.H., and Westaway, D. (2013). The prion protein modulates A-type K⁺ currents mediated by Kv4.2 complexes through dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6. *J Biol Chem* 288, 37241-37255.
- Mertens, J., Marchetto, M.C., Bardy, C., and Gage, F.H. (2016). Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 17, 424-437.
- Miranda, A., Pericuesta, E., Ramirez, M.A., and Gutierrez-Adan, A. (2011). Prion protein expression regulates embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *PLoS One* 6, e18422.
- Mironov, A., Jr., Latawiec, D., Wille, H., Bouzamondo-Bernstein, E., Legname, G., Williamson, R.A., Burton, D., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Peters, P.J. (2003). Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci* 23, 7183-7193.
- Mitteregger, G., Vosko, M., Krebs, B., Xiang, W., Kohlmansperger, V., Nolting, S., Hamann, G.F., and Kretzschmar, H.A. (2007). The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol* 17, 174-183.
- Moda, F. (2017). Protein Misfolding Cyclic Amplification of Infectious Prions. *Prog Mol Biol Transl Sci* 150, 361-374.
- Mok, T., Jaunmuktane, Z., Joiner, S., Campbell, T., Morgan, C., Wakerley, B., Golestani, F., Rudge, P., Mead, S., Jager, H.R., Wadsworth, J.D., Brandner, S., and Collinge, J. (2017). Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in a Patient with Heterozygosity at PRNP Codon 129. *N Engl J Med* 376, 292-294.

Bibliografia

- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529-540.
- Moore, R.A., Herzog, C., Errett, J., Kocisko, D.A., Arnold, K.M., Hayes, S.F., and Priola, S.A. (2006). Octapeptide repeat insertions increase the rate of protease-resistant prion protein formation. *Protein Sci* 15, 609-619.
- Moore, R.C. (1997). Gene targeting studies at the mouse prion protein locus. Doctoral Thesis, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Moore, R.C., Lee, I.Y., Silverman, G.L., Harrison, P.M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S.H., Chishti, M.A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A.F., Katamine, S., Carlson, G.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Melton, D.W., Tremblay, P., Hood, L.E., and Westaway, D. (1999). Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol* 292, 797-817.
- Moore, R.C., Mastrangelo, P., Bouzamondo, E., Heinrich, C., Legname, G., Prusiner, S.B., Hood, L., Westaway, D., DeArmond, S.J., and Tremblay, P. (2001). Doppel-induced cerebellar degeneration in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15288-15293.
- Morris, R.J., Parkyn, C.J., and Jen, A. (2006). Traffic of prion protein between different compartments on the neuronal surface, and the propagation of prion disease. *FEBS Lett* 580, 5565-5571.
- Moser, M., Colello, R.J., Pott, U., and Oesch, B. (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 14, 509-517.
- Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G., and Taraboulos, A. (1997). Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem* 272, 6324-6331.
- Neher, J.J., Emmrich, J.V., Fricker, M., Mander, P.K., Thery, C., and Brown, G.C. (2013). Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E4098-4107.
- Nelson, P.A., Sage, J.R., Wood, S.C., Davenport, C.M., Anagnostaras, S.G., and Boulanger, L.M. (2013). MHC class I immune proteins are critical for hippocampus-dependent memory and gate NMDAR-dependent hippocampal long-term depression. *Learn Mem* 20, 505-517.
- Nicolas, O., Gavin, R., and del Rio, J.A. (2009). New insights into cellular prion protein (PrP^c) functions: the "ying and yang" of a relevant protein. *Brain Res Rev* 61, 170-184.
- Nicoll, A.J., Panico, S., Freir, D.B., Wright, D., Terry, C., Risse, E., Herron, C.E., O'Malley, T., Wadsworth, J.D., Farrow, M.A., Walsh, D.M., Saibil, H.R., and Collinge, J. (2013). Amyloid-beta nanotubes are associated with prion protein-dependent synaptotoxicity. *Nat Commun* 4, 2416.
- Nishida, N., Tremblay, P., Sugimoto, T., Shigematsu, K., Shirabe, S., Petromilli, C., Erpel, S.P., Nakaoke, R., Atarashi, R., Houtani, T., Torchia, M., Sakaguchi, S., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Katamine, S. (1999). A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* 79, 689-697.
- Notari, S., Appleby, B.S., and Gambetti, P. (2018). Chapter 10 - Variably protease-sensitive prionopathy. In: *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 153, eds. M. Pocchiari and J. Manson: Elsevier, 175-190.
- Nuvolone, M., Hermann, M., Sorce, S., Russo, G., Tiberi, C., Schwarz, P., Minikel, E., Sanoudou, D., Pelczar, P., and Aguzzi, A. (2016). Strictly co-isogenic C57BL/6J-Prnp^{-/-} mice: A rigorous resource for prion science. *J Exp Med* 213, 313-327.
- Nuvolone, M., Kana, V., Hutter, G., Sakata, D., Mortin-Toth, S.M., Russo, G., Danska, J.S., and Aguzzi, A. (2013). SIRPalpha polymorphisms, but not the prion protein, control phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med* 210, 2539-2552.
- O'Kane, R.L., Martinez-Lopez, I., DeJoseph, M.R., Vina, J.R., and Hawkins, R.A. (1999). Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *J Biol Chem* 274, 31891-31895.

- Okada-Tsuchioka, M., Segawa, M., Kajitani, N., Hisaoka-Nakashima, K., Shibasaki, C., Morinobu, S., and Takebayashi, M. (2014). Electroconvulsive seizure induces thrombospondin-1 in the adult rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 48, 236-244.
- Olney, J.W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719-721.
- Ondrejčák, T., Klyubin, I., Corbett, G.T., Fraser, G., Hong, W., Mably, A.J., Gardener, M., Hammersley, J., Perkinson, M.S., Billinton, A., Walsh, D.M., and Rowan, M.J. (2018). Cellular Prion Protein Mediates the Disruption of Hippocampal Synaptic Plasticity by Soluble Tau In Vivo. *J Neurosci* 38, 10595-10606.
- Opazo, P., Sainlos, M., and Choquet, D. (2012). Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Curr Opin Neurobiol* 22, 453-460.
- Ordóñez-Gutiérrez, L., Torres, J.M., Gavín, R., Antón, M., Arroba-Espinosa, A.I., Espinosa, J.C., Vergara, C., Del Río, J.A., and Wandosell, F. (2013). Cellular prion protein modulates β -amyloid deposition in aged APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Aging*.
- Otto, M., Wiltfang, J., Cepek, L., Neumann, M., Mollenhauer, B., Steinacker, P., Ciesielczyk, B., Schulz-Schaeffer, W., Kretschmar, H.A., and Poser, S. (2002). Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 58, 192-197.
- Pallo, S.P., DiMaio, J., Cook, A., Nilsson, B., and Johnson, G.V.W. (2016). Mechanisms of tau and Abeta-induced excitotoxicity. *Brain Res* 1634, 119-131.
- Palmer, M.S., Dryden, A.J., Hughes, J.T., and Collinge, J. (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 352, 340-342.
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 383-400.
- Parchi, P., Capellari, S., Chin, S., Schwarz, H.B., Schechter, N.P., Butts, J.D., Hudkins, P., Burns, D.K., Powers, J.M., and Gambetti, P. (1999). A subtype of sporadic prion disease mimicking fatal familial insomnia. *Neurology* 52, 1757-1763.
- Parkin, E.T., Watt, N.T., Hussain, I., Eckman, E.A., Eckman, C.B., Manson, J.C., Baybutt, H.N., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2007). Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11062-11067.
- Parras, A., Anta, H., Santos-Galindo, M., Swarup, V., Elorza, A., Nieto-Gonzalez, J.L., Pico, S., Hernandez, I.H., Diaz-Hernandez, J.I., Belloc, E., Rodolosse, A., Parikshak, N.N., Penagarikano, O., Fernandez-Chacon, R., Irimia, M., Navarro, P., Geschwind, D.H., Mendez, R., and Lucas, J.J. (2018). Autism-like phenotype and risk gene mRNA deadenylation by CPEB4 mis-splicing. *Nature* 560, 441-446.
- Parrie, L.E., Crowell, J.A.E., Telling, G.C., and Bessen, R.A. (2018). The cellular prion protein promotes olfactory sensory neuron survival and axon targeting during adult neurogenesis. *Dev Biol* 438, 23-32.
- Passet, B., Halliez, S., Beringue, V., Laude, H., and Vilotte, J.L. (2013). The prion protein family: looking outside the central nervous system. *Prion* 7, 127-130.
- Pathmajeyan, M.S., Patel, S.A., Carroll, J.A., Seib, T., Striebel, J.F., Bridges, R.J., and Chesebro, B. (2011). Increased excitatory amino acid transport into murine prion protein knockout astrocytes cultured in vitro. *Glia* 59, 1684-1694.
- Patterson, M.A., Szatmari, E.M., and Yasuda, R. (2010). AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15951-15956.
- Pauly, P.C., and Harris, D.A. (1998). Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* 273, 33107-33110.

Bibliografia

Peng, Y.G., Clayton, E.C., Means, L.W., and Ramsdell, J.S. (1997). Repeated independent exposures to domoic acid do not enhance symptomatic toxicity in outbred or seizure-sensitive inbred mice. *Fundam Appl Toxicol* 40, 63-67.

Perez, M., Rojo, A.I., Wandosell, F., Diaz-Nido, J., and Avila, J. (2003). Prion peptide induces neuronal cell death through a pathway involving glycogen synthase kinase 3. *Biochem J* 372, 129-136.

Petri, M.K., Koch, P., Stenzinger, A., Kuchelmeister, K., Nestler, U., Paradowska, A., Steger, K., Brobeil, A., Viard, M., and Wimmer, M. (2011). PTPIP51, a positive modulator of the MAPK/Erk pathway, is upregulated in glioblastoma and interacts with 14-3-3 β and PTP1B in situ. *Histol Histopathol* 26, 1531-1543.

Pisa, D., Alonso, R., Rabano, A., Rodal, I., and Carrasco, L. (2015). Different Brain Regions are Infected with Fungi in Alzheimer's Disease. *Sci Rep* 5, 15015.

Platt, S.R. (2007). The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review. *Vet J* 173, 278-286.

Platzer, K., and Lemke, J.R. (2018). GRIN2B-Related Neurodevelopmental Disorder. University of Washington, Seattle.

Platzer, K., Yuan, H., Schutz, H., Winschel, A., Chen, W., Hu, C., Kusumoto, H., Heyne, H.O., Helbig, K.L., Tang, S., Willing, M.C., Tinkle, B.T., Adams, D.J., Depienne, C., Keren, B., Mignot, C., Frengen, E., Stromme, P., Biskup, S., Docker, D., Strom, T.M., Mefford, H.C., Myers, C.T., Muir, A.M., LaCroix, A., Sadleir, L., Scheffer, I.E., Brilstra, E., van Haelst, M.M., van der Smagt, J.J., Bok, L.A., Moller, R.S., Jensen, U.B., Millichap, J.J., Berg, A.T., Goldberg, E.M., De Bie, I., Fox, S., Major, P., Jones, J.R., Zackai, E.H., Abou Jamra, R., Rolfs, A., Leventer, R.J., Lawson, J.A., Roscioli, T., Jansen, F.E., Ranza, E., Korff, C.M., Lehesjoki, A.E., Courage, C., Linnankivi, T., Smith, D.R., Stanley, C., Mintz, M., McKnight, D., Decker, A., Tan, W.H., Tarnopolsky, M.A., Brady, L.I., Wolff, M., Dondit, L., Pedro, H.F., Parisotto, S.E., Jones, K.L., Patel, A.D., Franz, D.N., Vanzo, R., Marco, E., Ranells, J.D., Di Donato, N., Dobyns, W.B., Laube, B., Traynelis, S.F., and Lemke, J.R. (2017). GRIN2B encephalopathy: novel findings on phenotype, variant clustering, functional consequences and treatment aspects. *J Med Genet* 54, 460-470.

Plested, A.J., and Mayer, M.L. (2007). Structure and mechanism of kainate receptor modulation by anions. *Neuron* 53, 829-841.

Pocchiari, M., Puopolo, M., Croes, E.A., Budka, H., Gelpi, E., Collins, S., Lewis, V., Sutcliffe, T., Guilivi, A., Delasnerie-Laupretre, N., Brandel, J.P., Alperovitch, A., Zerr, I., Poser, S., Kretschmar, H.A., Ladogana, A., Rietvald, I., Mitrova, E., Martinez-Martin, P., de Pedro-Cuesta, J., Glatzel, M., Aguzzi, A., Cooper, S., Mackenzie, J., van Duijn, C.M., and Will, R.G. (2004). Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. *Brain* 127, 2348-2359.

Polymenidou, M., Heppner, F.L., Pelliccioli, E.C., Ulrich, E., Miele, G., Braun, N., Wopfner, F., Schatzl, H.M., Becher, B., and Aguzzi, A. (2004). Humoral immune response to native eukaryotic prion protein correlates with anti-prion protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2, 14670-14676.

Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S., and Sanacora, G. (2011). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci* 13, 22-37.

Powell, A.D., Toescu, E.C., Collinge, J., and Jefferys, J.G. (2008). Alterations in Ca²⁺-buffering in prion-null mice: association with reduced afterhyperpolarizations in CA1 hippocampal neurons. *J Neurosci* 28, 3877-3886.

Preisiche, O., Schultz, S.A., Apel, A., Kuhle, J., Kaeser, S.A., Barro, C., Gräber, S., Kuder-Buletta, E., LaFougere, C., Laske, C., Vöglein, J., Levin, J., Masters, C.L., Martins, R., Schofield, P.R., Rossor, M.N., Graff-Radford, N.R., Salloway, S., Ghetti, B., Ringman, J.M., Noble, J.M., Chhatwal, J., Goate, A.M., Benzinger, T.L.S., Morris, J.C., Bateman, R.J., Wang, G., Fagan, A.M., McDade, E.M., Gordon, B.A., and Jucker, M. (2019). Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 1.

Prodromidou, K., Papastefanaki, F., Sklaviadis, T., and Matsas, R. (2014). Functional cross-talk between the cellular prion protein and the neural cell adhesion molecule is critical for neuronal differentiation of neural stem/precursor cells. *Stem Cells* 32, 1674-1687.

- Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.
- Puckett, C., Concannon, P., Casey, C., and Hood, L. (1991). Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet* 49, 320-329.
- Race, B., Jeffrey, M., McGovern, G., Dorward, D., and Chesebro, B. (2017). Ultrastructure and pathology of prion protein amyloid accumulation and cellular damage in extraneural tissues of scrapie-infected transgenic mice expressing anchorless prion protein. *Prion* 11, 234-248.
- Race, B., Phillips, K., Kraus, A., and Chesebro, B. (2016). Phosphorylated human tau associates with mouse prion protein amyloid in scrapie-infected mice but does not increase progression of clinical disease. *Prion* 10, 319-330.
- Raja, W.K., Mungenast, A.E., Lin, Y.T., Ko, T., Abdurrob, F., Seo, J., and Tsai, L.H. (2016). Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes. *PLoS One* 11, e0161969.
- Rambold, A.S., Muller, V., Ron, U., Ben-Tal, N., Winklhofer, K.F., and Tatzelt, J. (2008). Stress-protective signalling of prion protein is corrupted by scrapie prions. *Embo j* 27, 1974-1984.
- Ramljak, S., Schmitz, M., Zafar, S., Wrede, A., Schenkel, S., Asif, A.R., Carimalo, J., Doeppner, T.R., Schulz-Schaeffer, W.J., Weise, J., and Zerr, I. (2015). Cellular prion protein directly interacts with and enhances lactate dehydrogenase expression under hypoxic conditions. *Experimental Neurology* 271, 155-167.
- Ramon y Cajal, S. (1911). *Histologie du Système Nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris Maloine.
- Ramos, A. (2008). Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci* 29, 493-498.
- Rangel, A., Burgaya, F., Gavin, R., Soriano, E., Aguzzi, A., and Del Rio, J.A. (2007). Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. *J Neurosci Res* 85, 2741-2755.
- Rangel, A., Madronal, N., Gruart, A., Gavin, R., Llorens, F., Sumoy, L., Torres, J.M., Delgado-Garcia, J.M., and Del Rio, J.A. (2009). Regulation of GABA(A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. *PLoS One* 4, e7592.
- Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P., and Ferreira, A. (2002). Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6364-6369.
- Ratte, S., Vreugdenhil, M., Boulton, J.K., Patel, A., Asante, E.A., Collinge, J., and Jefferys, J.G. (2011). Threshold for epileptiform activity is elevated in prion knockout mice. *Neuroscience* 179, 56-61.
- Raya, A., Rodríguez-Piza, I., Navarro, S., Richaud-Patin, Y., Guenechea, G., Sanchez-Danes, A., Consiglio, A., Bueren, J., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). A protocol describing the genetic correction of somatic human cells and subsequent generation of iPS cells. *Nat Protoc* 5, 647-660.
- Readhead, B., Haure-Mirande, J.V., Funk, C.C., Richards, M.A., Shannon, P., Haroutunian, V., Sano, M., Liang, W.S., Beckmann, N.D., Price, N.D., Reiman, E.M., Schadt, E.E., Ehrlich, M.E., Gandy, S., and Dudley, J.T. (2018). Multiscale Analysis of Independent Alzheimer's Cohorts Finds Disruption of Molecular, Genetic, and Clinical Networks by Human Herpesvirus. *Neuron* 99, 64-82.e67.
- Reid, I.C., and Stewart, C.A. (1997). Seizures, memory and synaptic plasticity. *Seizure* 6, 351-359.
- Rial, D., Duarte, F.S., Xikota, J.C., Schmitz, A.E., Dafre, A.L., Figueiredo, C.P., Walz, R., and Prediger, R.D. (2009). Cellular prion protein modulates age-related behavioral and neurochemical alterations in mice. *Neuroscience* 164, 896-907.
- Ribosa - Nogué, R.P., J. Gomez - Anson, B. Granell - Moreno, E. S á nchez - Valle, R. Kulisevsky, J. (2015). Gerstmann - Sträussler - Scheinker Disease Presenting with Atypical
- Parkinsonism, but Typical Magnetic Resonance Imaging Findings of Prion Disease. *Movement Disorders*, 93-95.

Bibliografia

Richt, J.A., and Hall, S.M. (2008). BSE case associated with prion protein gene mutation. *PLoS Pathog* 4, e1000156.

Richt, J.A., Kasinathan, P., Hamir, A.N., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., Vargas, F., Sathiyaseelan, J., Wu, H., Matsushita, H., Koster, J., Kato, S., Ishida, I., Soto, C., Robl, J.M., and Kuroiwa, Y. (2007). Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol* 25, 132-138.

Rodriguez-Moreno, A., Herreras, O., and Lerma, J. (1997). Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron* 19, 893-901.

Rodriguez-Moreno, A., Lopez-Garcia, J.C., and Lerma, J. (2000). Two populations of kainate receptors with separate signaling mechanisms in hippocampal interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1293-1298.

Rossi, D., Cozzio, A., Flechsig, E., Klein, M.A., Rulicke, T., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (2001). Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *Embo j* 20, 694-702.

Rushworth, J.V., Griffiths, H.H., Watt, N.T., and Hooper, N.M. (2013). Prion protein-mediated toxicity of amyloid-beta oligomers requires lipid rafts and the transmembrane LRP1. *J Biol Chem* 288, 8935-8951.

Russo, S.J., and Nestler, E.J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 14, 609.

Saborio, G.P., Permanne, B., and Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810-813.

Sah, P., and Davies, P. (2000). Calcium-activated potassium currents in mammalian neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27, 657-663.

Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T., and Noda, T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380, 528-531.

Sakudo, A., Lee, D.C., Saeki, K., Nakamura, Y., Inoue, K., Matsumoto, Y., Itohara, S., and Onodera, T. (2003). Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 660-667.

Salazar, S.V., Gallardo, C., Kaufman, A.C., Herber, C.S., Haas, L.T., Robinson, S., Manson, J.C., Lee, M.K., and Strittmatter, S.M. (2017). Conditional Deletion of Prnp Rescues Behavioral and Synaptic Deficits after Disease Onset in Transgenic Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 37, 9207-9221.

Sales, N., Rodolfo, K., Hassig, R., Faucheux, B., Di Giambardino, L., and Moya, K.L. (1998). Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci* 10, 2464-2471.

Sanchez-Danes, A., Richaud-Patin, Y., Carballo-Carbajal, I., Jimenez-Delgado, S., Caig, C., Mora, S., Di Guglielmo, C., Ezquerro, M., Patel, B., Giral, A., Canals, J.M., Memo, M., Alberch, J., Lopez-Barneo, J., Vila, M., Cuervo, A.M., Tolosa, E., Consiglio, A., and Raya, A. (2012). Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol Med* 4, 380-395.

Santos, T.G., Silva, I.R., Costa-Silva, B., Lepique, A.P., Martins, V.R., and Lopes, M.H. (2011). Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein. *Stem Cells* 29, 1126-1136.

Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., and Schachner, M. (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 169, 341-354.

Scharfman, H.E., Mercurio, T.C., Goodman, J.H., Wilson, M.A., and MacLusky, N.J. (2003). Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 23, 11641-11652.

Scheckel, C., and Aguzzi, A. (2018). Prions, prionoids and protein misfolding disorders. *Nat Rev Genet* 19, 405-418.

- Scheefhals, N., and MacGillavry, H.D. (2018). Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. *Mol Cell Neurosci* 91, 82-94.
- Schmitz, M., Greis, C., Ottis, P., Silva, C.J., Schulz-Schaeffer, W.J., Wrede, A., Koppe, K., Onisko, B., Requena, J.R., Govindarajan, N., Korth, C., Fischer, A., and Zerr, I. (2014a). Loss of Prion Protein Leads to Age-Dependent Behavioral Abnormalities and Changes in Cytoskeletal Protein Expression. *Mol Neurobiol*.
- Schmitz, M., Villar-Pique, A., Llorens, F., Gmitterova, K., Hermann, P., Varges, D., Zafar, S., Lingor, P., Vanderstichele, H., Demeyer, L., Stoops, E., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., and Zerr, I. (2018). Cerebrospinal Fluid Total and Phosphorylated alpha-Synuclein in Patients with Creutzfeldt-Jakob Disease and Synucleinopathy. *Mol Neurobiol*.
- Schmitz, M., Zafar, S., Silva, C.J., and Zerr, I. (2014b). Behavioral abnormalities in prion protein knockout mice and the potential relevance of PrP(C) for the cytoskeleton. *Prion* 8, 381-386.
- Seibenhener, M.L., and Wooten, M.C. (2015). Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*, e52434.
- Senatore, A., Colleoni, S., Verderio, C., Restelli, E., Morini, R., Condiliffe, S.B., Bertani, I., Mantovani, S., Canovi, M., Micotti, E., Forloni, G., Dolphin, A.C., Matteoli, M., Gobbi, M., and Chiesa, R. (2012). Mutant PrP suppresses glutamatergic neurotransmission in cerebellar granule neurons by impairing membrane delivery of VGCC alpha(2)delta-1 Subunit. *Neuron* 74, 300-313.
- Sherrington. (1906). The integrative action of the nervous system, eds. CT and Y.U. Press, New Haven.
- Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blattler, T., Brandner, S., Gotz, J., Rulicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mering, C., Hangartner, C., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1998). Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93, 203-214.
- Shyng, S.L., Moulder, K.L., Lesko, A., and Harris, D.A. (1995). The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 270, 14793-14800.
- Simpson, M., Johanssen, V., Boyd, A., Klug, G., Masters, C.L., Li, Q.X., Pamphlett, R., McLean, C., Lewis, V., and Collins, S.J. (2013). Unusual clinical and molecular-pathological profile of gerstmann-Straussler-Scheinker disease associated with a novel PRNP mutation (V176G). *JAMA Neurol* 70, 1180-1185.
- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., Isacson, O., and Jaenisch, R. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136, 964-977.
- Solis, G.P., Radon, Y., Sempou, E., Jechow, K., Stuermer, C.A., and Malaga-Trillo, E. (2013). Conserved roles of the prion protein domains on subcellular localization and cell-cell adhesion. *PLoS One* 8, e70327.
- Sommer, B., Kohler, M., Sprengel, R., and Seeburg, P.H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67, 11-19.
- Sonati, T., Reimann, R.R., Falsig, J., Baral, P.K., O'Connor, T., Hornemann, S., Yaganoglu, S., Li, B., Herrmann, U.S., Wieland, B., Swayampakula, M., Rahman, M.H., Das, D., Kav, N., Riek, R., Liberski, P.P., James, M.N., and Aguzzi, A. (2013). The toxicity of anti-prion antibodies is mediated by the flexible tail of the prion protein. *Nature* 501, 102-106.
- Song, Z., Zhao, D., and Yang, L. (2013). Metabolism of minor isoforms of prion proteins: Cytosolic prion protein and transmembrane prion protein. *Neural Regen Res* 8(30):2868-78.
- Sotiropoulos, I., Galas, M.C., Silva, J.M., Skoulakis, E., Wegmann, S., Maina, M.B., Blum, D., Sayas, C.L., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., Spillantini, M.G., Sousa, N., Avila, J., Medina, M., Mudher, A., and Buee, L. (2017). Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathol Commun* 5, 91.
- Spillantini, M.G., Goedert, M., Crowther, R.A., Murrell, J.R., Farlow, M.R., and Ghetti, B. (1997). Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4113-4118.

Bibliografia

- Stafstrom, C.E., and Carmant, L. (2015). Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. In: Cold Spring Harb Perspect Med, vol. 5.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., and Prusiner, S.B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229-240.
- Steele, A.D., Emsley, J.G., Ozdinler, P.H., Lindquist, S., and Macklis, J.D. (2006). Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3416-3421.
- Striebel, J.F., Race, B., and Chesebro, B. (2013a). Prion protein and susceptibility to kainate-induced seizures: genetic pitfalls in the use of PrP knockout mice. *Prion* 7, 280-285.
- Striebel, J.F., Race, B., Pathmajeyan, M., Rangel, A., and Chesebro, B. (2013b). Lack of influence of prion protein gene expression on kainate-induced seizures in mice: studies using congenic, coisogenic and transgenic strains. *Neuroscience* 238, 11-18.
- Suh, Y.H., Chang, K., and Roche, K.W. (2018). Metabotropic glutamate receptor trafficking. *Mol Cell Neurosci* 91, 10-24.
- Sumioka, A., Yan, D., and Tomita, S. (2010). TARP phosphorylation regulates synaptic AMPA receptors through lipid bilayers. *Neuron* 66, 755-767.
- Sweeney, P., Park, H., Baumann, M., Dunlop, J., Frydman, J., Kopito, R., McCampbell, A., Leblanc, G., Venkateswaran, A., Nurmi, A., and Hodgson, R. (2017). Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Transl Neurodegener* 6, 6.
- Takada, L.T., Kim, M.O., Cleveland, R.W., Wong, K., Forner, S.A., Gala, II, Fong, J.C., and Geschwind, M.D. (2017). Genetic prion disease: Experience of a rapidly progressive dementia center in the United States and a review of the literature. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 174, 36-69.
- Takada, L.T., Kim, M.O., Metcalf, S., Gala, II, and Geschwind, M.D. (2018). Prion disease. *Handb Clin Neurol* 148, 441-464.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Taylor, D.R., and Hooper, N.M. (2006). The prion protein and lipid rafts. *Mol Membr Biol* 23, 89-99.
- Thompson, A.G.B., Luk, C., Heslegrave, A.J., Zetterberg, H., Mead, S.H., Collinge, J., and Jackson, G.S. (2018). Neurofilament light chain and tau concentrations are markedly increased in the serum of patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, and tau correlates with rate of disease progression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 89, 955-961.
- Toth, A.B., Terauchi, A., Zhang, L.Y., Johnson-Venkatesh, E.M., Larsen, D.J., Sutton, M.A., and Umemori, H. (2013). Synapse maturation by activity-dependent ectodomain shedding of SIRPalpha. *Nat Neurosci* 16, 1417-1425.
- Tranchant, C., Sergeant, N., Wattez, A., Mohr, M., Warter, J.M., and Delacourte, A. (1997). Neurofibrillary tangles in Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome with the A117V prion gene mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63, 240-246.
- Tremblay, P., Bouzamondo-Bernstein, E., Heinrich, C., Prusiner, S.B., and DeArmond, S.J. (2007). Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain Res* 1139, 60-67.
- Turner, M.L. (2018). Safety of blood, blood derivatives, and plasma-derived products. *Handb Clin Neurol* 153, 463-472.
- Tuzi, N.L., Clarke, A.R., Bradford, B., Aitchison, L., Thomson, V., and Manson, J.C. (2004). Cre-loxP mediated control of PrP to study transmissible spongiform encephalopathy diseases. *Genesis* 40, 1-6.

- Tzingounis, A.V., and Wadiche, J.I. (2007). Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 8, 935-947.
- Um, J.W., Kaufman, A.C., Kostylev, M., Heiss, J.K., Stagi, M., Takahashi, H., Kerrisk, M.E., Vortmeyer, A., Wisniewski, T., Koleske, A.J., Gunther, E.C., Nygaard, H.B., and Strittmatter, S.M. (2013). Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein. *Neuron* 79, 887-902.
- Um, J.W., Nygaard, H.B., Heiss, J.K., Kostylev, M.A., Stagi, M., Vortmeyer, A., Wisniewski, T., Gunther, E.C., and Strittmatter, S.M. (2012). Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci* 15, 1227-1235.
- Urrea, L., Ferrer, I., Gavín, R., and del Río, J.A. (2017). The cellular prion protein (PrP^C) as neuronal receptor for α -synuclein. In: *Prion*, vol. 11, 226-233.
- Urrea, L., Segura-Feliu, M., Masuda-Suzukake, M., Hervera, A., Pedraz, L., Garcia Aznar, J.M., Vila, M., Samitier, J., Torrents, E., Ferrer, I., Gavín, R., Hagesawa, M., and Del Río, J.A. (2018). Involvement of Cellular Prion Protein in alpha-Synuclein Transport in Neurons. *Mol Neurobiol* 55, 1847-1860.
- van Strien, N.M., Cappaert, N.L., and Witter, M.P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 10, 272-282.
- Velayos, J.L., Irujo, A., Cuadrado-Tejedor, M., Paternain, B., Moleres, F.J., and Ferrer, V. (2009). The cellular prion protein and its role in Alzheimer disease. *Prion* 3, 110-117.
- Vergara, C., Ordonez-Gutierrez, L., Wandosell, F., Ferrer, I., del Río, J.A., and Gavín, R. (2015). Role of PrP^C Expression in Tau Protein Levels and Phosphorylation in Alzheimer's Disease Evolution. *Mol Neurobiol* 51, 1206-1220.
- Vilches, S., Vergara, C., Nicolas, O., Mata, A., Del Río, J.A., and Gavín, R. (2016). Domain-Specific Activation of Death-Associated Intracellular Signalling Cascades by the Cellular Prion Protein in Neuroblastoma Cells. *Mol Neurobiol* 53, 4438-4448.
- Vincent, P., and Mulle, C. (2009). Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* 158, 309-323.
- Vizuete, A.F.K., Hansen, F., Negri, E., Leite, M.C., de Oliveira, D.L., and Goncalves, C.A. (2018). Effects of dexamethasone on the Li-pilocarpine model of epilepsy: protection against hippocampal inflammation and astrogliosis. *J Neuroinflammation* 15, 68.
- Walter, E.D., Stevens, D.J., Visconte, M.P., and Millhauser, G.L. (2007). The prion protein is a combined zinc and copper binding protein: Zn²⁺ alters the distribution of Cu²⁺ coordination modes. *J Am Chem Soc* 129, 15440-15441.
- Walz, R., Amaral, O.B., Rockenbach, I.C., Roesler, R., Izquierdo, I., Cavalheiro, E.A., Martins, V.R., and Brentani, R.R. (1999). Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40, 1679-1682.
- Wang, G.R., Shi, S., Gao, C., Zhang, B.Y., Tian, C., Dong, C.F., Zhou, R.M., Li, X.L., Chen, C., Han, J., and Dong, X.P. (2010). Changes of tau profiles in brains of the hamsters infected with scrapie strains 263 K or 139 A possibly associated with the alteration of phosphate kinases. *BMC Infect Dis* 10, 86.
- Wang, L., Lu, Y., Deng, S., Zhang, Y., Yang, L., Guan, Y., Matozaki, T., Ohnishi, H., Jiang, H., and Li, H. (2012). SHPS-1 deficiency induces robust neuroprotection against experimental stroke by attenuating oxidative stress. *J Neurochem* 122, 834-843.
- Wang, X.F., Dong, C.F., Zhang, J., Wan, Y.Z., Li, F., Huang, Y.X., Han, L., Shan, B., Gao, C., Han, J., and Dong, X.P. (2008). Human tau protein forms complex with PrP and some GSS- and fCJD-related PrP mutants possess stronger binding activities with tau in vitro. *Mol Cell Biochem* 310, 49-55.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.

Bibliografia

- Watt, N.T., Taylor, D.R., Kerrigan, T.L., Griffiths, H.H., Rushworth, J.V., Whitehouse, I.J., and Hooper, N.M. (2012). Prion protein facilitates uptake of zinc into neuronal cells. *Nat Commun* 3, 1134.
- Watts, J.C., Bourkas, M.E.C., and Arshad, H. (2018). The function of the cellular prion protein in health and disease. *Acta Neuropathol* 135, 159-178.
- Watts, J.C., and Westaway, D. (2007). The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 1772, 654-672.
- Weis, S., Haybaeck, J., Dulay, J.R., and Llenos, I.C. (2008). Expression of cellular prion protein (PrP(c)) in schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *J Neural Transm (Vienna)* 115, 761-771.
- Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., and Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121, 419-420.
- Wenthold, R.J., Petralia, R.S., Blahos, J., II, and Niedzielski, A.S. (1996). Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16, 1982-1989.
- Westaway, D., Cooper, C., Turner, S., Da Costa, M., Carlson, G.A., and Prusiner, S.B. (1994a). Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6418-6422.
- Westaway, D., Daude, N., Wohlgemuth, S., and Harrison, P. (2011). The PrP-like proteins Shadoo and Doppel. *Top Curr Chem* 305, 225-256.
- Westaway, D., DeArmond, S.J., Cayetano-Canlas, J., Groth, D., Foster, D., Yang, S.L., Torchia, M., Carlson, G.A., and Prusiner, S.B. (1994b). Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* 76, 117-129.
- Westergaard, L., Christensen, H.M., and Harris, D.A. (2007). The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772, 629-644.
- Wieser HG , Schindler K , and D, Z. (2006). EEG in Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Neurophysiol May;117(5):935-51*.
- Wilham, J.M., Orru, C.D., Bessen, R.A., Atarashi, R., Sano, K., Race, B., Meade-White, K.D., Taubner, L.M., Timmes, A., and Caughey, B. (2010). Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog* 6, e1001217.
- Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., and Smith, P.G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347, 921-925.
- Willard, S.S., and Koochekpour, S. (2013). Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int J Biol Sci* 9, 948-959.
- Wille, H., and Requena, J.R. (2018). The Structure of PrP(Sc) Prions. *Pathogens* 7.
- Willnow, T.E., Petersen, C.M., and Nykjaer, A. (2008). VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. *Nat Rev Neurosci* 9, 899-909.
- Wisden, W., and Seeburg, P.H. (1993). A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci* 13, 3582-3598.
- Worster-Drought C, Greenfield JG, and WH, M. (1940). A form of familial presenile dementia with spastic paralysis. *Brain* 63: 237 - 254.
- Wren, M.C., Zhao, J., Liu, C.C., Murray, M.E., Atagi, Y., Davis, M.D., Fu, Y., Okano, H.J., Ogaki, K., Strongosky, A.J., Tacik, P., Rademakers, R., Ross, O.A., Dickson, D.W., Wszolek, Z.K., Kanekiyo, T., and Bu, G. (2015). Frontotemporal dementia-associated N279K tau mutant disrupts subcellular vesicle trafficking and induces cellular stress in iPSC-derived neural stem cells. *Mol Neurodegener* 10, 46.

- Wulf, M.A., Senatore, A., and Aguzzi, A. (2017). The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biol* 15, 34.
- Yamazaki, M., Oyanagi, K., Mori, O., Kitamura, S., Ohyama, M., Terashi, A., Kitamoto, T., and Katayama, Y. (1999). Variant Gerstmann-Straussler syndrome with the P105L prion gene mutation: an unusual case with nigral degeneration and widespread neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol* 98, 506-511.
- You, H., Tsutsui, S., Hameed, S., Kannanayakal, T.J., Chen, L., Xia, P., Engbers, J.D., Lipton, S.A., Stys, P.K., and Zamponi, G.W. (2012). Abeta neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein, and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1737-1742.
- Young, R., Passet, B., Vilotte, M., Cribiu, E.P., Beringue, V., Le Provost, F., Laude, H., and Vilotte, J.L. (2009). The prion or the related Shadoo protein is required for early mouse embryogenesis. *FEBS Lett* 583, 3296-3300.
- Yu, G., Chen, J., Xu, Y., Zhu, C., Yu, H., Liu, S., Sha, H., Xu, X., Wu, Y., Zhang, A., Ma, J., and Cheng, G. (2009). Generation of goats lacking prion protein. *Mol Reprod Dev* 76, 3.
- Zanata, S.M., Lopes, M.H., Mercadante, A.F., Hajj, G.N., Chiarini, L.B., Nomizo, R., Freitas, A.R., Cabral, A.L., Lee, K.S., Juliano, M.A., de Oliveira, E., Jachieri, S.G., Burlingame, A., Huang, L., Linden, R., Brentani, R.R., and Martins, V.R. (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *Embo j* 21, 3307-3316.
- Zeng, F., Watt, N.T., Walmsley, A.R., and Hooper, N.M. (2003). Tethering the N-terminus of the prion protein compromises the cellular response to oxidative stress. *J Neurochem* 84, 480-490.
- Zerr, I., and Parchi, P. (2018). Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Handb Clin Neurol* 153, 155-174.
- Zerr, I., Zafar, S., Schmitz, M., and Llorens, F. (2017). Cerebrospinal fluid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Handb Clin Neurol* 146, 115-124.
- Zhang, K., Donnelly, C.J., Haeusler, A.R., Grima, J.C., Machamer, J.B., Steinwald, P., Daley, E.L., Miller, S.J., Cunningham, K.M., Vidensky, S., Gupta, S., Thomas, M.A., Hong, I., Chiu, S.L., Haganir, R.L., Ostrow, L.W., Matunis, M.J., Wang, J., Sattler, R., Lloyd, T.E., and Rothstein, J.D. (2015). The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature* 525, 56-61.
- Zhu, J.J., Esteban, J.A., Hayashi, Y., and Malinow, R. (2000). Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci* 3, 1098-1106.
- Zou, W.Q., Puoti, G., Xiao, X., Yuan, J., Qing, L., Cali, I., Shimoji, M., Langeveld, J.P., Castellani, R., Notari, S., Crain, B., Schmidt, R.E., Geschwind, M., Dearmond, S.J., Cairns, N.J., Dickson, D., Honig, L., Torres, J.M., Mastrianni, J., Capellari, S., Giaccone, G., Belay, E.D., Schonberger, L.B., Cohen, M., Perry, G., Kong, Q., Parchi, P., Tagliavini, F., and Gambetti, P. (2010). Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol* 68, 162-172.

ANNEX

INFORME FACTOR D'IMPACTE

Per la present, faig constar el *Factor d'impacte* corresponent a les revistes on s'han publicat els articles científics que conformen la Tesis doctoral de Andreu Matamoros i Anglès.

- **Molecular Neurobiology:** 5.076
- **Scientific Reports:** 4.122

Barcelona, 2019

Director i tutor de la Tesis

Dr. José Antonio del Río Fernández

INFORME DE PARTICIPACIÓ

El Dr. **José Antonio del Río Fernández**, director i tutor de la Tesis Doctoral “Noves funcions de la PrP^C en neurotransmissió, neuroprotecció i neurodegeneració”, realitzada pel doctorand **Andreu Matamoros i Anglès**, informa que la participació del doctorand en els articles científics que conformen la present tesis ha estat:

En l'article “**iPS Cell Cultures from a Gerstmann-Straussler-Scheinker Patient with the Y218N PRNP Mutation Recapitulate tau Pathology**” publicat a la revista *Molecular Neurobiology*, el doctorand ha participat com a co-autor principal en el disseny dels experiments i és el principal responsable del seu desenvolupament i realització.

En l'article “**Involvement of PrP^C in kainate-induced excitotoxicity in several mouse strains**” publicat a la revista *Scientific Reports*, el doctorand ha participat com a co-autor en el disseny dels experiments i la seva realització.

Per última, faig constar que cap d'aquests articles ha estat utilitzat per l'elaboració d'altres tesis doctorals

Barcelona, 2019

Director i tutor de la Tesis

Dr. José Antonio del Río Fernández

